

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



## **TESIS DOCTORAL**

### **Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Beatriz Romero Martínez**

Directoras

Ana Mateos García  
Lucía de Juan Ferré  
Alicia Aranaz Martín

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**

**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)**

**Servicio de Micobacterias**



**TESIS DOCTORAL**

***TUBERCULOSIS BOVINA: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y SU  
IMPLICACIÓN EN SANIDAD ANIMAL Y SALUD PÚBLICA***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Beatriz Romero Martínez**

**Bajo la dirección de los doctores:**

**Ana Mateos García, Lucía de Juan Ferré y Alicia Aranaz Martín**

**Madrid, 2010**





**FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID**

Dña. Ana Mateos García, Profesora Titular; Dña. Alicia Aranaz Martín, Contratada Doctor; y Dña. Lucía de Juan Ferré, Profesora Ayudante, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implicación en Sanidad Animal y Salud Pública”** ha sido realizada por la licenciada en Biología Dña. Beatriz Romero Martínez en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

**Fdo. Alicia Aranaz**

**Fdo. Ana Mateos**

**Fdo. Lucía de Juan**





*La realización de este trabajo ha sido posible gracias al:*

**Contrato de Personal de Apoyo a la Investigación en el marco del  
IV Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica  
2005-2008 de la Comunidad de Madrid**

*Y se ha realizado en el marco de los siguientes proyectos:*

Acción Coordinada de la Unión Europea:  
**"Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and  
Epidemiology of Mycobacterial Diseases"** (SSPE-CT-2004-501903)

Proyecto Europeo:  
**"Strategies for the eradication of bovine tuberculosis  
(TB-STEP)"** (FP7-KBBE-2007-212414)

Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de I+D+I  
**Desarrollo de la técnica *Multilocus Sequence Typing* en el complejo *Mycobacterium  
tuberculosis*. Estudio inmunológico de las variantes genéticas obtenidas y  
aplicación de los resultados epidemiológicos e inmunológicos en las campañas  
de erradicación"** (AGL2001-2029)

*Y se ha realizado en el marco de los convenios de colaboración  
con las siguientes instituciones:*

**Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos**  
(Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM))  
**Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio**  
(Comunidad de Madrid)  
**Dirección General de Producción Agropecuaria**  
(Junta de Castilla y León)



A Mis Padres

A Javi, El Motor De Mi Vida



## Agradecimientos

Después de un largo y sinuoso recorrido de ocho años llega el momento de finalizar esta etapa de mi vida (la tesis) y no puedo acabarla sin tener unas palabras llenas de agradecimiento para todos aquellos que han estado a mi lado durante este recorrido.

En primer lugar quiero agradecer la dedicación de mis directores de tesis: a Alicia Aranaz, la persona que ha dirigido de forma más directa mis trabajos de investigación, y que me ha guiado y enseñado desde cómo escribir un artículo, muy torpemente en los inicios, hasta mis primeros pasos en los congresos y reuniones internacionales; a Ana Mateos, que dio la oportunidad (¡a otra bióloga!) de adentrarse en el mundo veterinario, y en el maravilloso y lento mundo de las micobacterias, y que con gran interés ha corregido este manuscrito final; y a Lucía de Juan, directora, compañera y amiga de fatigas en el laboratorio, que ha dedicado mucho de su valioso tiempo a la enseñanza de una bióloga, cabezota en ocasiones. Gracias mil por hacer agradable el trabajo con tu gran disposición, tu amabilidad, y tus dotes para la enseñanza. A todos, gracias de corazón por vuestro esmero en la corrección de esta memoria para que saliese adelante y por todas las ideas constructivas.

No puedo olvidarme de mi otro director en la retaguardia, Lucas Domínguez, que me ha animado siempre a la realización de nuevos proyectos, y que ha querido potenciar lo mejor de mí en cada momento, por su preocupación constante por el futuro profesional, y que me hace sentir partícipe de este Centro de diagnóstico e investigación. Sabes que valoro muchísimo el esfuerzo dedicado a la lectura minuciosa de esta memoria y de los manuscritos, y todas tus sugerencias al respecto.

Muchas gracias a todos los que han pertenecido en algún momento al grupo de micobacterias. En primer lugar a la gente con la que comencé como Natalia, que supo enseñarme a trabajar y respetar a unas micobacterias tan poco amigables, con mucha seriedad al principio, pero que con el paso del tiempo llegó a ser una gran compañera del laboratorio y de cafés (creo que te debo unos cuantos ya), y que es una de las personas más eficientes que he conocido. Tengo un buenísimo recuerdo de esos años y es gracias a ti y a Lucía, por supuesto. Mi más sincero agradecimiento a Anabel, con la que empecé mis trabajos de secuenciación con el complejo tuberculoso y que me inició en la lectura de los artículos científicos.

Especial cariño y sentimiento de cercanía tengo por mis compañeros de batalla en el laboratorio durante años, Julio y Javi. Para Julio, mi gran compañero de faena durante tanto tiempo.... eternamente agradecida por los momentos de risas en el labo, en la balanza (¿cómo nos pudimos equivocar?) y por compartir el despacho y ordenador tantas horas. Nunca pensé encontrar un amigo con más fe en mi trabajo y en mi persona. Gracias por estar siempre ahí y por echarme un cable en los peores momentos. ¡Y a Javi, claro! El tiempo me ha demostrado lo que vales, tanto por tus conocimientos micobacterianos como por tu gran personalidad. Todos esos números que no cuadraban en los informes (¡menudas risas!) y nuestro viaje a Nueva Zelanda no habrían sido lo mismo sin ti. Gracias de corazón a los dos.

A mis compañeras moleculares del grupo, Elena y Sabrina, con las que he compartido sitio una larga temporada. Ha sido un placer estar con vosotras y compartir esos buenos momentos interrumpidos por un sonoro climatizador, siempre dispuestas a colaborar en lo que surgiera. A las dos os deseo lo mejor. Y no me puedo olvidar de toda la gente que forma parte del Servicio de Micobacterias o que lo hizo en su día: Fran, Nuria Moya, Alex, Taty, Fernando, Laura, Cris, Johanna, Leo, Carmen, Nuria Álvarez, Cristina Lozano, Tariq, Ángel y Elisa, entre otros. Aunque es imposible definiros en tan pocas líneas, todos tenéis el mismo afán porque las cosas salgan bien, y eso sería imposible sin ser un grupo de extraordinarios compañeros (o amigos en muchos casos), y eso os hace únicos y encantadores. A pesar de todos los sinsabores de la acreditación, ésta nos ha dado momentos de risas (y algún que otro llanto...) y me he sentido muy orgullosa de todos vosotros (¡espero no haber acabado con vuestra paciencia!). Gracias por haberme ayudado sin condiciones en todo, más si cabe en esta última etapa.

Gracias a los demás compañeros de Visavet. ¡Son tantos! A todos aquellos que estuvieron en algún momento en la misma situación de tesis que yo, como José Luis (que alegraba a cualquiera en el labo), Nerea (¡siento que no pertenezcas al grupo de micobacteriosos por una semana!) y Maguis (¡la pesadilla de la tesis siempre termina!), y a todos los incluidos en ese animado grupo que sube a la cafetería: Marta (¡más salada!), Pili (¡sonrisa insaciable!), Sonia (¡menuda compi de despacho más buena que me he echado!), Gema, Irene, Laura de las Heras, y otros tantos que ya no están.

Especial cariño para María Mazariegos, con la que he compartido muchas horas en el último año (¡acreditación!), y que me sigue asombrando por el "orden" de su mesa de trabajo. A toda la gente del grupo de Bioseguridad-Calidad (las Lauras, David, Pedro, Alberto, y Marisol) con los que hemos tenido nuestras idas y venidas con los temas de acreditación, pero que siempre han llegado a buen puerto. También a toda la gente del grupo de ZTA, empezando por Concha, María, Isa, Fani, Carol, Mari Carmen, Nis, Susana y Mauri; y al grupo de DICM: Almudena, Lucía, Leydis, Vero, Alberto y Noelia. Muchas gracias a Marga, siempre con la agenda de Lucas en mano para cualquier consulta, y a Laura Torres. Mi más sincero agradecimiento a Sergio y a Carlos, que me han echado una mano (pero grande) en esto de la edición y diseño de la tesis. Gracias por todo el trabajo que hacéis desde atrás que no siempre es tan visible y por vuestra disposición para ayudar en cualquier momento. Y a Arancha y Carmen, gracias por recibirnos cada día con una sonrisa en la cara.

A la Dirección del Centro VISAVET le agradezco la confianza depositada en mí durante este tiempo, y la siempre afirmativa respuesta a todas mis solicitudes de asistencias a cursos, congresos y demás actos de formación. No han caído en saco roto. También quiero agradecer el interés y preocupación que siempre ha mostrado Joaquín en todo lo que he hecho (¡recordaré saludarte cuando te vea, descuida!).

Ya fuera del laboratorio no me puedo olvidar de mis compañeros de carrera, Manolo, Perí, Toño, Rocío, Ana y Henar, con lo que pasé cinco años inolvidables y con los que empecé mis primeras hazañas en el laboratorio. Gracias sobre todo a mi gran amigo y compañero Manolo, con el que las horas dedicadas a trabajos y los inicios en micología en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de

Biología fueron geniales. Al final todo el esfuerzo de estos años ha merecido la pena. Espero invitarte pronto para celebrarlo.

También quiero agradecer a Enrique Gómez-Mampaso sus enseñanzas en el hospital Ramón y Cajal durante mi estancia allí. Fue estupendo aprender de la tuberculosis desde la perspectiva humana. Ya sabes que me hubiera encantado que formaras parte de mi tribunal de tesis. Ha sido un placer trabajar contigo durante la estancia en el hospital. Gracias mil a todos lo que he conocido en los proyectos de investigación europeos como Glyn, Noel, Stephen, Robin, Maria Laura, Philip, Beatrice, Maria G., e Irmgard, entre otros, que tanto han contribuido en mi formación, y sobre todo que me han hecho sentirme más cómoda en mis exposiciones en inglés.

Quiero también agradecer a mis amigos todo el apoyo que me han brindado estos interminables años. ¡Creo que por lo que saben ya llevo tres o cuatro años leyendo la tesis! Sobre todo a Merce y Luis, Marta y Óscar y el pequeño Hugo, y todos aquellos que han estado pendientes de la evolución de mi tesis (Didi y Pablo, entre otros), por su incondicional ánimo en todo momento, y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos que nos han servido de distracción. Gracias por vuestro interés y preocupación. Espero poder contar con vosotros siempre.

Para ir terminado la lista, gracias a mi familia. A mis tíos, Mari y Carmelo, Conchi y Felix, Cruz y Carlos, Herminia y Jacinto, que tanto ánimo me han dado para que acabara la tesis. Ha sido un gran tema de conversación en muchas comidas y reuniones. A mis cuatro abuelos (Amancio y Otilia, Ramón y Prudencia), a los que quiero con locura y que aún preguntan en ocasiones en qué trabajo. Siempre me recuerdan que el esfuerzo dedicado al trabajo tiene su recompensa. Os llevo en mi corazón y espero que alguno pueda verme en mi defensa y sentirse orgulloso de mí. A mis adorables sobrinos: Alba (la futura veterinaria), María (la revoltosa con gran ingenio) y Javier (el más dulce y cabezota), que son la alegría de todos los encuentros familiares, y con los que disfruto como una niña más (a veces soy peor que ellos). A M<sup>a</sup> Ángeles y Antonio, por todos los encuentros fugaces en vuestra casa para un rato de distracción. Me he sentido como en casa. Y por último a Bautista y Angelines, que me lo han dado todo como a una hija más, siempre preocupados por la evolución de la tesis. Espero saber agradecerlos lo querida que me siento al formar parte de esta segunda familia.

En particular, gracias mil al motor de mi vida, Javi, que ha compartido su día a día conmigo durante catorce emocionantes años. La sensación de felicidad y tranquilidad que he tenido durante todo este tiempo es en parte mérito tuyo (aunque a veces no sea fácil). Gracias por tu forma de ser, tan contagiosamente alegre y generosa, tu disposición absoluta en todo momento y, sobre todo por los viajes de evasión del mundo real preparados con tanta ilusión (¿para cuándo el próximo?). Eres un sol y confío en un futuro lleno de sorpresas contigo. Espero no agotar nunca tu paciencia y que sientas que esta tesis es parte de los dos, por todas las emociones que la han rodeado en este tiempo.

Y ya para finalizar, gracias a mi hermano y a mis padres porque les debo absolutamente todo. Siempre habéis confiado en que podía llevar a cabo este proyecto y me habéis apoyado desde el principio. A mi hermano Carlos, con el que he compartido muchos años en casa y del que me siento profundamente orgullosa



por su generosidad, su cariño y sus buenas cualidades para el trabajo (creo que Cristina, la dulce parlanchina, es testigo de ello). Papá, gracias por tu humor insaciable y satírico (aunque algunos no lo entiendan) con el que hemos crecido, que forma parte de tu gran personalidad, y sin el que no serías el mismo. Ya sabes que habrá una gran celebración por este acto y que después de tantos años te vas a quitar un gran peso de encima (tanto estudio a tus espaldas.....). A mi madre, a la que tengo millones de cosas que agradecer. Eres el ejemplo a seguir de cualquiera por tu afán de superación, tus ganas constantes de aprender y tu entera dedicación a la familia (¡cuántas satisfacciones!). Espero no perder nunca esa sonrisa tuya con la que siempre te tengo presente. Que este pequeño paso os haga sentir muy orgullosos de la educación que nos habéis dado.

Mucha más gente me ha animado en todos estos años; y a todos os agradezco vuestro apoyo aunque no os nombre expresamente. Sé que este trabajo no hubiera sido posible sin vosotros y quiero haceros partícipes de la alegría que siento en este momento. Gracias de corazón a todos por hacer cada día mejor y por formar parte de mi vida.

## ÍNDICE



ÍNDICE .....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
1. GÉNERO <i>Mycobacterium</i> .....	3
2. COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
2.2. <i>Mycobacterium bovis</i> .....	9
2.3. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	9
2.4. <i>Mycobacterium caprae</i> .....	10
2.5. <i>Mycobacterium africanum</i> .....	10
2.6. <i>Mycobacterium canetti</i> .....	11
2.7. <i>Mycobacterium microti</i> .....	11
2.8. <i>Mycobacterium pinnipedii</i> .....	12
2.9. <i>Oryx bacillus</i> .....	12
2.10. <i>Dassie bacillus</i> .....	12
2.11. Evolución del complejo <i>M. tuberculosis</i> .....	13
3. TUBERCULOSIS EN ANIMALES CAUSADA POR <i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i> .....	17
3.1. Distribución e impacto económico.....	18
3.2. Tuberculosis en animales de vida libre .....	21
3.3. Tuberculosis en el ganado bovino producido por <i>M. tuberculosis</i> .....	24
3.4. Patogénesis.....	26
3.4.1. Sintomatología clínica y lesiones .....	27
3.5. Diagnóstico .....	29
3.5.1. Detección directa del agente etiológico .....	29
3.5.1.1. Cultivo bacteriológico .....	29
3.5.1.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador.....	31
3.6. Identificación.....	32
3.6.1. Gen que codifica el ARN ribosómico .....	32
3.6.2. Gen que codifica la proteína MPB70.....	34
3.6.3. Regiones de diferenciación, RD.....	34
4. TUBERCULOSIS EN HUMANOS CAUSADA POR <i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i> .....	35
4.1. Rutas de transmisión.....	37
4.1.1. Transmisión respiratoria.....	38
4.1.2. Transmisión oral.....	39

4.1.3.	Transmisión cutánea y por mucosas .....	40
4.2.	Tratamiento de la tuberculosis .....	40
5.	SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA.....	43
5.1.	Métodos convencionales.....	43
5.2.	Métodos automatizados .....	44
5.3.	Métodos basados en mutaciones.....	45
5.4.	Interferencia entre el piruvato y la isoniazida.....	48
6.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..	49
6.1.	Secuencias de inserción .....	49
6.1.1.	IS6110 .....	50
6.1.2.	IS1081 .....	51
6.2.	Secuencias de repetición cortas (SSR) .....	51
6.2.1.	Secuencias con un alto contenido en GC .....	51
6.2.2.	Secuencias de repetición del triplete GTG.....	52
6.2.3.	Secuencias de repetición con polimorfismos mayoritarios.....	52
6.3.	Otras secuencias de repetición .....	53
6.3.1.	Locus DR .....	53
6.3.2.	Número variable de repeticiones en tándem.....	54
6.4.	Genes del metabolismo basal celular .....	54
6.5.	Técnicas basadas en la detección de las secuencias diana.....	56
6.5.1.	Análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción.....	56
6.5.2.	Polimorfismo en los fragmentos de restricción mediada por PCR.....	58
6.5.3.	Unión rápida mediada por PCR.....	59
6.5.4.	Unión mediada por PCR.....	60
6.5.5.	Espoligotipado .....	60
6.5.6.	Análisis de las repeticiones en tándem de múltiples loci .....	65
6.6.	Estudios epidemiológicos basados en técnicas moleculares .....	69
6.7.	Bases de datos .....	71
	OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS .....	73
	CAPÍTULO I. Estudio epidemiológico de la tuberculosis en ganado bovino y animales salvajes mediante cultivo microbiológico y caracterización molecular de los aislados .....	79
	CAPÍTULO II. Diseño y aplicación de las técnicas de caracterización molecular como herramienta epidemiológica en aislados del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de origen animal y humano .....	99

---

CAPÍTULO III. Estudio de la sensibilidad antibiótica de aislados del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de origen animal y humano frente a los fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis en humanos .....	123
DISCUSIÓN .....	139
CONCLUSIONES .....	153
RESUMEN/SUMMARY .....	157
ANEXO .....	167
Anexo I. Lista de abreviaturas .....	169
Anexo II. Lista de figuras .....	171
Anexo III. Lista de tablas .....	172
Anexo IV. Lista de otros trabajos derivados de la tesis .....	173
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	197



# INTRODUCCIÓN





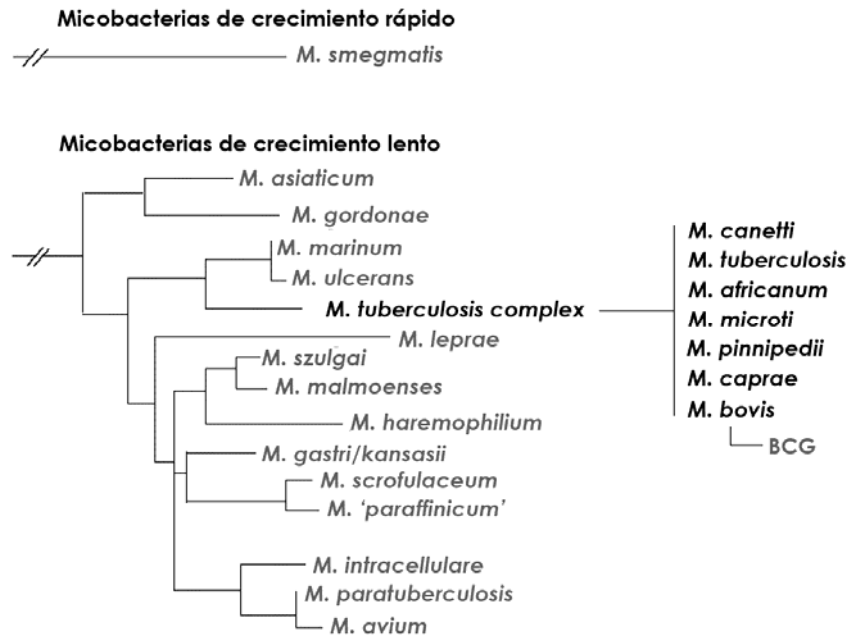
## 1. GÉNERO *Mycobacterium*

Según la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) el género *Mycobacterium* (M.) está encuadrado en el phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*. Este género comprende más de 120 especies y se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales. Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y la ácido-alcohol resistencia. Esta última propiedad se debe al elevado contenido en lípidos en su pared celular, entre los que se incluyen los característicos ácidos micólicos.

A lo largo de los años se han elaborado numerosas clasificaciones de este género, atendiendo primero a las características fenotípicas, como la producción de pigmentos en condiciones de luz y/u oscuridad (Runyon, 1959), a su patogenicidad y, desde finales del siglo pasado, a los genotipos. La clasificación más intuitiva y de más fácil aplicación es aquella que divide las micobacterias en dos grupos: micobacterias no cultivables o difícilmente cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y cultivables. Dentro de esta última se establece una subdivisión en micobacterias de crecimiento rápido (aquellas que dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días), y las de crecimiento lento (las que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido). Según se indica en la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, las micobacterias de crecimiento lento y rápido están muy relacionadas en términos de homología del ácido desoxirribonucleico (ADN). Mediante la secuenciación del gen que codifica la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), se ha determinado que casi la totalidad de las micobacterias de crecimiento lento [excepto *M. terrae* (Ninet et al., 1996) y *M. celatum* (Reischl et al., 1998)] poseen una copia de este gen, mientras que las crecedoras rápidas, excepto *M. chelonae* y *M. abscessus*, presentan al menos dos (Tortoli et al., 2004). El análisis de la secuencia de este gen, así como la conformación de su estructura secundaria, ha sido la herramienta más utilizada para realizar los estudios taxonómicos y filogenéticos del género (Tortoli, 2006) (Figuras 1 y 2).

Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de especies saprofitas de vida libre, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Frecuentemente se les denomina "micobacterias ambientales", "micobacterias atípicas" o "micobacterias no tuberculosas", si bien este último término puede aplicarse a algunas bacterias de crecimiento lento (Figura 2).

Por otro lado, el grupo de micobacterias de crecimiento lento engloba las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública.



**Figura 1.** Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento (adapatao de Biet et al., 2005)

En este grupo se encuadra el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC), que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y en mamíferos. El complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*, MAC), también posee una elevada relevancia en el ámbito veterinario y humano. Un estudio detallado de las características fenotípicas y un análisis de ADN estableció tres subespecies: *M. avium* subespecie *avium* (agente causal de la tuberculosis aviar), *M. avium* subsp. *silvaticum* (productor de micobacteriosis en aves y rumiantes), y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne) (Thorel et al., 1990). En el año 2002 se definió una nueva subespecie, *M. avium* subsp. *hominissuis*, que agrupaba las cepas pertenecientes a *M. avium* subsp. *avium* aisladas con mayor frecuencia de hospedadores humanos y porcinos y del medio ambiente, y que tenía características fenotípicas y genotípicas diferentes a los aislados de aves (Mijls et al., 2002). Dentro de este complejo MAC también se incluye la especie *M. intracellulare* (Runyon, 1967) que es un patógeno relevante en humanos. Ya durante la última década se han descrito nuevos miembros de este complejo aviar tales como *M. arosiense* (Bang et al., 2008), *M. chimaera* (Tortoli et al., 2004), *M. columbiense* (Murcia et al., 2006), *M. marsiellense*, *M. bouchedurhonense* y *M. timonense* (Ben Salah et al., 2009).

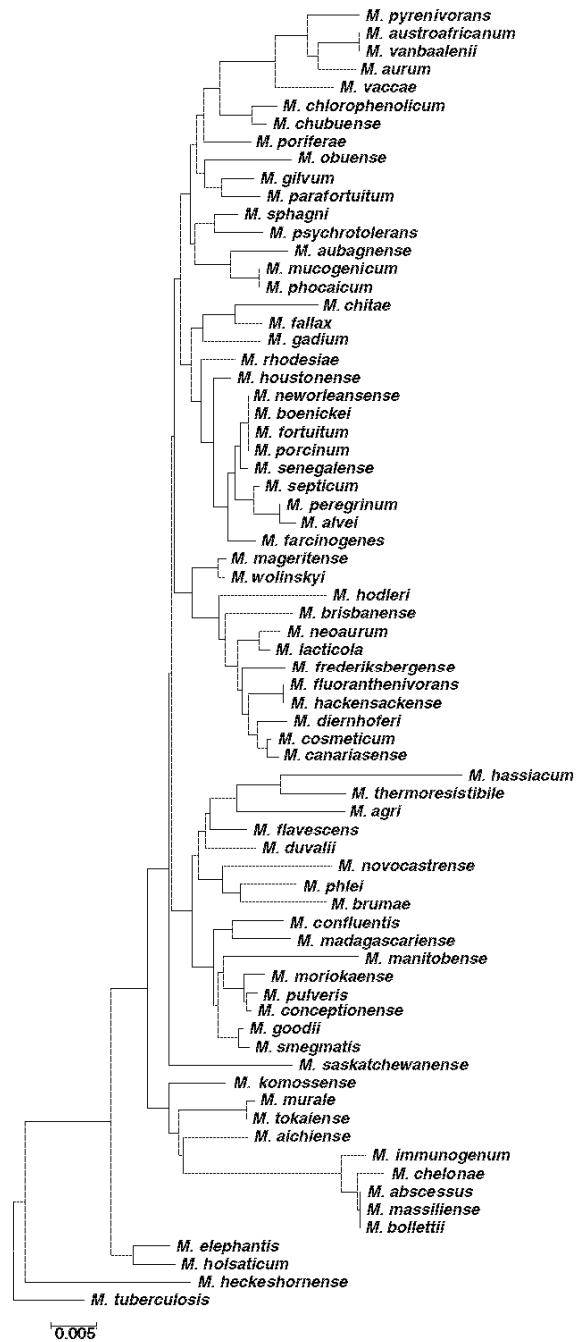


Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento rápido (Tortoli, 2006)



## 2. COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) se caracteriza por causar tuberculosis en humanos y animales e incluye varias especies: *M. tuberculosis* (Koch, 1882), *M. bovis* (Karlson y Lessel, 1970), *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin), *M. africanum* (Castets *et al.*, 1969), *M. microti* (Reed, 1957), *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003), *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003), *M. canetti* (van Soolingen *et al.*, 1997), el *Oryx baillus* (aislado a partir del órice de Arabia (*Oryx leucoryx*) (Lomme *et al.*, 1976) y el *Dassie bacillus* (aislado a partir del damán roquero, *Procavia capensis*) (Wagner *et al.*, 1958). Todas ellas se caracterizan por presentar una homología del 99,95% en su genoma, con una proporción elevada de bases G+C (aproximadamente el 65%), y poseer una secuencia idéntica de la subunidad 16S del ARNr (Böddinghaus *et al.*, 1990; Sreevatsan *et al.*, 1997a). Sin embargo, estas especies difieren ampliamente en la preferencia de hospedador, fenotipos y patogenicidad.

Tradicionalmente, la identificación de estas especies se ha realizado basándose en sus características fenotípicas, existiendo una amplia lista de pruebas bioquímicas, tales como la reducción de nitratos, la producción de niacina, o la resistencia a la piracinamida, y las propiedades de cultivo que ayudan a discernir entre varias especies de micobacterias (Rastogi *et al.*, 2001) (Tabla 1).

Sin embargo, debido a que las características fenotípicas no permiten una identificación precisa, rápida y segura de todas las especies, la identificación actual se basa principalmente en la presencia o ausencia de ciertas regiones del genoma (*regions of difference*, RDs) (Gordon *et al.*, 1999) o la presencia de mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Éstas se han detectado gracias al desarrollo de técnicas moleculares y al conocimiento de los genomas de algunas especies incluidas en este complejo (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2005; Behr y Mostowy, 2007).

### 2.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (*sensu stricto*) fue descrito por primera vez por Robert Koch en 1882, de ahí su sobrenombre "bacilo de Koch" (Koch, 1882). Principalmente afecta al hombre y a los primates, y es responsable del 99% de todos los casos de tuberculosis en humanos. Sin embargo, también ha sido encontrado en el ganado bovino (Prasad *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2008; Fetene *et al.*, 2009) y caprino (Cadmus *et al.*, 2009), en cerdos (Parra *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2009), en gatos y perros (Clercx *et al.*, 1992; Aranaz *et al.*, 1996b; Erwin *et al.*, 2004), aves (Hoop *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2008), y varias especies de animales salvajes, incluyendo algunas de las que se encuentran en los parques zoológicos (Montali *et al.*, 2001; Alexander *et al.*, 2002; Une y Mori, 2007).

En 1998 se hizo pública la secuencia completa del genoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998), que ha sido la base para establecer su relación con otros miembros de MTBC, así como para realizar los estudios posteriores sobre la evolución de este complejo.

Tabla 1. Características fenotípicas de las principales especies del complejo *M. tuberculosis*

Especie	Variedad	Morfología colonias	Aspecto cultivo	TCH	O <sub>2</sub>	Producción Niacina	Reducción nitratos	PZA
<b>M. tuberculosis</b>	Clásica	Rugosa	Eugónico	R	AER	+	+	S
	Asiática	Rugosa	Eugónico	S	AER	+	+	S
<b>M. africanum</b>	Tipo I	Rugosa	Disgónico	S	MIC	V	-	S
	Tipo II	Rugosa	Disgónico	S	MIC	V	+	S
<b>M. microti</b>	-	Lisa	Disgónico	S	AER	+	-	S
<b>M. caprae</b>	-	Lisa	Disgónico	S*	MIC	-	-	S
<b>M. bovis</b>	Bovina clásica	Lisa	Disgónico	S	MIC	-	-	R
	BCG	Rugosa	Eugónico	S	AER	-	-	R
<b>M. pinnipedii</b>	-	Rugosa	Disgónico	S	AER	-	-	S

TCH: hidracida del ácido 2-tiofenolcarboxílico 5-10 µg/ml. PZA: 50 µg/ml. \* Resistente a 1 y 2 µg TCH/ml, pero sensible a 5 y 10 µg/ml.  
S; sensible. R; resistente.  
AER; aerobio; MIC; microaerófilo.  
V; resultado variable.  
PZA; pirazinamida

## 2.2. *Mycobacterium bovis*

A pesar de haber sido utilizado con anterioridad para referirse a las cepas productoras de tuberculosis bovina, el nombre de *Mycobacterium bovis* no fue reconocido oficialmente hasta 1970 (Karlson y Lessel, 1970). Actualmente es conocida por ser el principal agente causante de la tuberculosis bovina. Sin embargo, este bacilo tuberculoso tiene el rango de hospedadores más amplio de todos los miembros de MTBC. El principal grupo de animales afectados por este bacilo se encuadra en la familia Bovidae (bóvidos), subfamilia Bovinae (bovinos) y, dentro de ésta en la tribu Bovini, que engloba distintos géneros: *Bubalus* (búfalos), *Bos* (bueyes), o *Bison* (bisontes). A parte de los bovinos, este patógeno también se ha aislado de otros bóvidos, como los incluidos en la subfamilia Caprinae (caprinos), en el que se encuentran los géneros *Capra* (cabra) (Cousins, 2001; Crawshaw *et al.*, 2008; Cadmus *et al.*, 2009) y *Ovis* (ovejas) (Malone *et al.*, 2003). Su relevancia como agente etiológico de la tuberculosis en la familia Suidae (suidos), y en concreto en el género *Sus* (cerdos y jabalíes) también es importante (Parra *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2010). Otras especies afectadas han sido los caballos (Monreal *et al.*, 2001), perros (Ellis *et al.*, 2006; Shrikishna *et al.*, 2009) y gatos (Aranaz *et al.*, 1996b; Monies *et al.*, 2000). Además se ha aislado de una amplia gama de animales salvajes de vida libre, como los zorros, ciervos, gamos, jabalíes, tejones, zarigüellas, lince, liebres, y primates no humanos, entre otros (Gallagher y Clifton-Hadley, 2000; O'Brien *et al.*, 2002; Aranaz *et al.*, 2004a; Corner, 2006; Ryan *et al.*, 2006; Une y Mori, 2007). También afecta al hombre debido al carácter zoonótico de la enfermedad (Dankner *et al.*, 1993; Cosivi *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2010).

El grupo liderado por Garnier y colaboradores realizó la secuenciación del genoma del aislado *M. bovis* AF2122/97 (Garnier *et al.*, 2003). Gracias a este estudio se confirmó que el genoma de *M. bovis* es más reducido que el de *M. tuberculosis*.

## 2.3. *Mycobacterium bovis* BCG

*Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin) es una cepa de *M. bovis* atenuada por sucesivos cultivos en medio con patata, bilis y glicerol, entre los años 1908 y 1919. De esta cepa original se han mantenido subcultivos en diferentes laboratorios durante décadas, produciéndose una deriva genética que ha originado diferentes cepas (Grange *et al.*, 1983). En función de su crecimiento en cobayas y ratones, dependiendo de la multiplicación en el punto de inoculación y la diseminación al bazo desde los ganglios linfáticos, se clasifican en fuertes (por ejemplo las cepas Pasteur y Copenhagen) y débiles (por ejemplo Glaxo). *M. bovis* BCG posee el crecimiento y la morfología de *M. tuberculosis*, y las características bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos característicos de *M. bovis*.

*M. bovis* BCG es administrado como vacuna frente a la tuberculosis en los países en vías de desarrollo a los recién nacidos y en aquellos países en los que la enfermedad se considera endémica. En España se administró hasta finales de la década de los 70. Además se ha considerado de utilidad en la prevención de la reaparición del cáncer de vejiga, ya que reactiva el sistema inmunológico inhibiendo el crecimiento del tumor (Herr y Morales, 2008). Aunque se considera una



cepa atenuada existen algunas descripciones de infecciones diseminadas por BCG en pacientes inmunodeprimidos (Mignard *et al.*, 2006).

#### 2.4. *Mycobacterium caprae*

Los aislados españoles de MTBC procedentes de cabras fueron originalmente clasificados como *M. bovis* (Aranaz *et al.*, 1996a). Sin embargo, estudios fenotípicos y genotípicos realizados en 1999 propusieron la subespeciación de estos aislados como *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz *et al.*, 1999). Sin embargo, tres años después Niemann y colaboradores sugirieron un cambio en la nomenclatura de estas cepas tomando la denominación de *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann *et al.*, 2002), ya que asumían una mayor proximidad entre los aislados caprinos y *M. bovis* que con *M. tuberculosis*. Posteriormente Aranaz y colaboradores aportaron nuevas pruebas moleculares y esta subespecie fue elevada a especie *Mycobacterium caprae* (Aranaz *et al.*, 2003).

El hospedador principal de esta especie bacteriana es la cabra aunque, como ocurre con otros miembros de MTBC, no se excluye la posibilidad de infección a otras especies animales. De hecho, en los últimos años se han encontrado aislados en otras especies domesticadas como el ganado bovino, ovino y porcino, estando en algunas ocasiones en contacto estrecho con las cabras (Aranaz *et al.*, 1996a; Aranaz *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2008; Boniotti *et al.*, 2009). Al igual que ocurre con *M. bovis*, también se han aislado *M. caprae* en animales salvajes, tales como el ciervo y el jabalí (Gortázar *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2005). De igual modo, también se han identificado casos de tuberculosis en humanos producidos por *M. caprae* (Gutiérrez *et al.*, 1997; Prodinger *et al.*, 2002; Kubica *et al.*, 2003).

#### 2.5. *Mycobacterium africanum*

*Mycobacterium africanum* fue descrito como nueva especie en 1969 (Castets *et al.*, 1969). Las publicaciones existentes sugieren que *M. africanum* difiere de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el hospedador, la fuente de infección, la distribución geográfica, la virulencia y la patogénesis. Esta especie tiene importancia como productor de la tuberculosis en el continente africano, causando infecciones principalmente en el hombre y en los primates (Thorel, 1980). Por otra parte, también han sido descritos algunos casos de tuberculosis en ganado vacuno producido por *M. africanum* (Rahim *et al.*, 2007).

Las cepas de *M. africanum* presentan una heterogeneidad fenotípica que dificulta su identificación en algunos casos. Los genotipos y fenotipos de esta especie varían dependiendo de la distribución geográfica (Haas *et al.*, 1997a; Haas *et al.*, 1997b). Collins y colaboradores usaron la prueba de la reducción del nitrato para dividir las cepas en dos grupos: grupo I (negativo) y grupo II (positivo) (Collins *et al.*, 1982). Los aislados del grupo I estaban asociados generalmente con África occidental y los del grupo II con África oriental, aunque más recientemente se ha encontrado la misma proporción de estos grupos en ambos extremos del continente africano. La tasa de aislamiento de esta especie en otros continentes es muy baja (Grange y Yates, 1989). Por otro lado, la virulencia de esta especie en modelos

experimentales es menor comparada con *M. tuberculosis* (Castets y Sarrat, 1969) y el patrón de la enfermedad es también distinto habiéndose aislado muy esporádicamente, por ejemplo, de humanos con tuberculosis genitourinaria (Grange y Yates, 1989).

## 2.6. *Mycobacterium canetti*

*Mycobacterium canetti* es una variante muy rara de *M. tuberculosis* y ha sido aislado normalmente de pacientes africanos o con alguna conexión con este continente. Fue descrito por primera vez en Francia por Canetti en 1969 y denominado como tal por van Soolingen y colaboradores (van Soolingen *et al.*, 1997). Aunque comparte la homología con el resto de miembros de MTBC en lo que respecta al ARNr 16S, *M. canetti* difiere en varios aspectos, incluyendo polimorfismos en ciertos genes del metabolismo basal (*house-keeping genes*), por ejemplo el gen *recA*, el número de copias de la secuencia de inserción IS1081 (una única copia), la morfología de las colonias (lisas y brillantes) y el contenido lipídico de la pared celular, entre otros (van Soolingen *et al.*, 1997; Brosch *et al.*, 2002).

## 2.7. *Mycobacterium microti*

*M. microti* fue aislado en 1930 de ratas de campo (Wells y Oxen, 1937) y denominado como tal por el doctor Reed (Reed, 1957). Esta especie afecta principalmente a pequeños roedores (Cousins *et al.*, 1994; Lutze-Wallace *et al.*, 2006), aunque ciertos animales como los gatos (Gunn-Moore *et al.*, 1996; Kremer *et al.*, 1998), cerdos (Huitema y Jaartsveld, 1967) y las llamas (Pattyn *et al.*, 1970), parecen ser especialmente sensibles. Todos estos casos se han detectado en clínicas veterinarias y, por lo tanto, es improbable que reflejen la situación real debido a las dificultades en el diagnóstico laboratorial. Particularmente, preocupa la transmisión de *M. microti* a los animales de compañía, principalmente los gatos, ya que podrían infectarse de roedores salvajes enfermos. Sin embargo, hasta la fecha, esta hipótesis no es cierta ya que los genotipos encontrados en *M. microti* aislados de gatos y de roedores no son iguales (Kremer *et al.*, 1998). La incidencia de la infección por *M. microti* en granjas y animales domésticos es desconocida aunque se ha aislado de cerdos (Taylor *et al.*, 2006).

A diferencia del estudio realizado por Kremer y colaboradores, Smith y colaboradores realizaron un estudio en Gran Bretaña sobre aislados de *M. microti* procedentes de distintas especies, tales como gatos, alpacas tejones, vacas, cerdos, hurones, ratones de campo, nutrias, ponis y humanos (Smith *et al.*, 2009a). Smith estableció que los perfiles moleculares más frecuentemente encontrados en los gatos se correspondían con los más comunes en otros mamíferos aunque no consideró a los felinos como el reservorio que mantiene la enfermedad sino un simple transmisor de la misma. Sorprendentemente, estableció una relación entre la coexistencia de *M. microti* y *M. bovis*: las áreas en las que se encontró *M. microti* en animales salvajes y en gatos se correspondían con zonas de baja prevalencia de tuberculosis bovina producida por *M. bovis*. Esto sugirió que una infección por *M. microti* podría suponer cierta protección a una infección por *M. bovis*.

También se han publicado algunas descripciones, aunque escasas, en pacientes inmunosuprimidos o con alguna alteración en el sistema inmune (van Soolingen *et al.*, 1998; Emmanuel *et al.*, 2007). Además, *M. microti* también se ha usado en ensayos clínicos para valorar su eficacia y seguridad como vacuna frente a la tuberculosis, observándose que es una vacuna segura aunque existe discrepancia en su eficacia comparada con la vacuna con *M. bovis* BCG (Hart y Sutherland, 1977; Manabe *et al.*, 2002).

## **2.8. *Mycobacterium pinnipedii***

El nombre inicial que se le asignó a esta bacteria fue el bacilo de las focas o "seal bacillus", debido al hospedador en el que se aisló por primera vez (Cousins *et al.*, 1993) y fue propuesta como especie nueva de MTBC en 2003 (Cousins *et al.*, 2003). Entre 1986 y 1995 fue aislado de casos de tuberculosis en leones marinos cautivos y en libertad, y en varias especies de focas en Nueva Zelanda, Australia, América del Sur y Reino Unido (Forshaw y Phelps, 1991; Cousins, 1995; Bernardelli *et al.*, 1996). Aunque las focas parecen ser su hospedador natural, también es patógeno en cobayas, conejos, humanos (Thompson *et al.*, 1993; Kiers *et al.*, 2008), tapires y, posiblemente en vacuno.

## **2.9. *Oryx bacillus***

El *Oryx bacillus* fue aislado por primera vez de dos órices (también llamado órix, antílope o gacela órice) en 1976 (Lomme *et al.*, 1976). Este bacilo se ha identificado en escasas ocasiones y siempre asociado a las distintas especies de antílopes, tanto en libertad como en cautividad (van Soolingen *et al.*, 1994; Greth *et al.*, 1994). Este bacilo fue identificado como *M. bovis* en los primeros estudios por sus similitudes en el genotipo con la excepción en el número de copias de la secuencia de inserción IS6110 (hasta 20 copias). Sin embargo, un exhaustivo análisis genómico detectó mutaciones en el gen *gyrB* no descritas previamente y su evolución dentro de MTBC se presupone anterior a *M. bovis* y *M. caprae* (Huard *et al.*, 2006).

## **2.10. *Dassie bacillus***

El *Dassie bacillus* fue identificado por primera vez a finales de los años 50 como un microbio capaz de sobrevivir en ambientes ácidos, de crecimiento rápido, causante de tuberculosis pulmonar en el llamado damán roquero o damán de El Cabo (*Procavia capensis*) (Wagner *et al.*, 1958; Smith, 1960). Este bacilo fue aislado de nuevo en los años 80 al causar tuberculosis en una colonia de damanes en cautividad en un zoo de Australia y de un suricata en un zoo de Suecia (Cousins *et al.*, 1994; Mostowy *et al.*, 2002). Inicialmente, *Dassie bacillus* ha sido propuesto como una variante atenuada de *M. microti* por su fenotipia y, a pesar de conocerse otras características biológicas del mismo que le distinguen de *M. microti*, esta idea persiste en la actualidad (Frota *et al.*, 2004).

### 2.11. Evolución del complejo *M. tuberculosis*

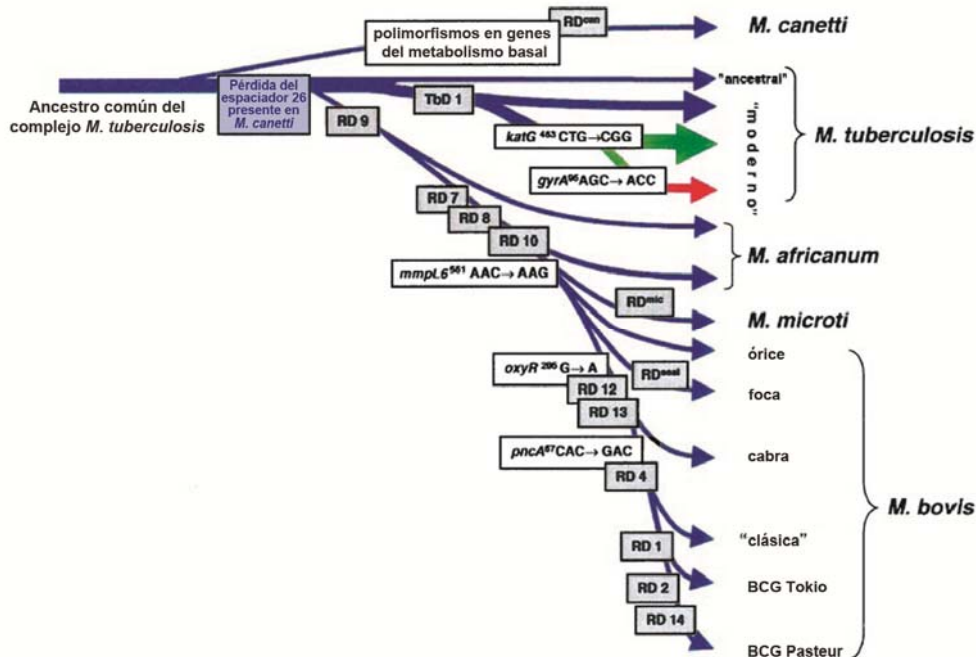
Debido al alto grado de homología entre los miembros de MTBC, Sreevatsan y colaboradores sugirieron la aparición de un "cuello de botella", presumiblemente en el momento de la especiación, hecho que se ha estimado que tuvo lugar hace 15.000-20.000 años (Sreevatsan *et al.*, 1997a). También se ha especulado que *M. tuberculosis*, el agente etiológico que principalmente causa la tuberculosis en humanos, ha evolucionado a partir de *M. bovis*, ya que este último tiene un mayor rango de hospedadores y se presumía que con el paso del tiempo se produjo una especialización en lo referente al hospedador (Stead *et al.*, 1995). Sin embargo, ambas hipótesis fueron propuestas antes de conocer las secuencias completas de los genomas de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) y *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003) y previos a la comparación de ciertas regiones variables en los miembros de MTBC.

En las dos últimas décadas algunos autores han mostrado que las sustituciones nucleotídicas encontradas entre las distintas especies de MTBC y entre cepas de la misma especie no son una fuente aparente de diversidad genética debido a la escasez de las mismas y a la localización de éstas en regiones intergénicas en un 50% de los casos (Gordon *et al.*, 2001; Brosch *et al.*, 2001). Por otro lado, la secuenciación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* dio a conocer que este último posee un genoma más reducido que *M. tuberculosis* (66.040 pb) y que no presenta ningún gen específico del mismo aunque existen diferencias significativas en algunas proteínas implicadas en la interacción con el hospedador (Brosch *et al.*, 2001; Garnier *et al.*, 2003).

En el año 2002 fue propuesto un esquema de especiación del complejo *M. tuberculosis* en el que se detalló de forma precisa la pérdida de regiones de diferenciación y/o mutaciones puntuales en una gran selección de aislados del complejo (Brosch *et al.*, 2002) (Figura 3). En ausencia de recombinación entre cepas una vez que ha ocurrido una delección en una región no repetitiva del cromosoma, ésta no puede ser sustituida, y esa delección es un marcador de una única célula y de todos sus descendientes. Bajo esta premisa y según se observa en la figura 3, la especiación ha ido ocurriendo en base a la pérdida de regiones de diferenciación (RD) y de la aparición de polimorfismos en varios genes bacterianos, tales como los que codifican la catalasa (*katG*), la subunidad A de la girasa (*gyrA*), una proteína de membrana (*mmpL6*), la nicotinamidas/piracinamidas (*pncA*) y el pseudogen *oxyR*. A la misma conclusión se llegó gracias a un estudio similar realizado por Mostowy y colaboradores (Mostowy *et al.*, 2002). Ambos estudios, unidos al hallazgo arqueológico de un aislado del complejo *M. tuberculosis* procedente de un bisón datado con 17.000 años, y su posterior análisis genómico, confirmaron una mayor similitud entre *M. tuberculosis* y *M. africanum* con este aislado ancestro que con *M. bovis* (Rothschild *et al.*, 2001).

En el año 2005, Mostowy y colaboradores corroboraron estas mismas delecciones en los miembros de MTBC mediante la secuenciación de 28 aislados de MTBC, incluyendo todas las especies. Además publicaron otras delecciones en *M. caprae* y *M. bovis*, tales como RD5 ó N-RD25 para la especie caprina, y N-RD17, RDpan ó RD17 para la bovina (Mostowy *et al.*, 2005). De forma añadida, la ausencia de varios genes

incluidos en estas regiones, implicados en el metabolismo celular, síntesis de lípidos u otros compuestos, aportaron información para establecer esta filogenia.

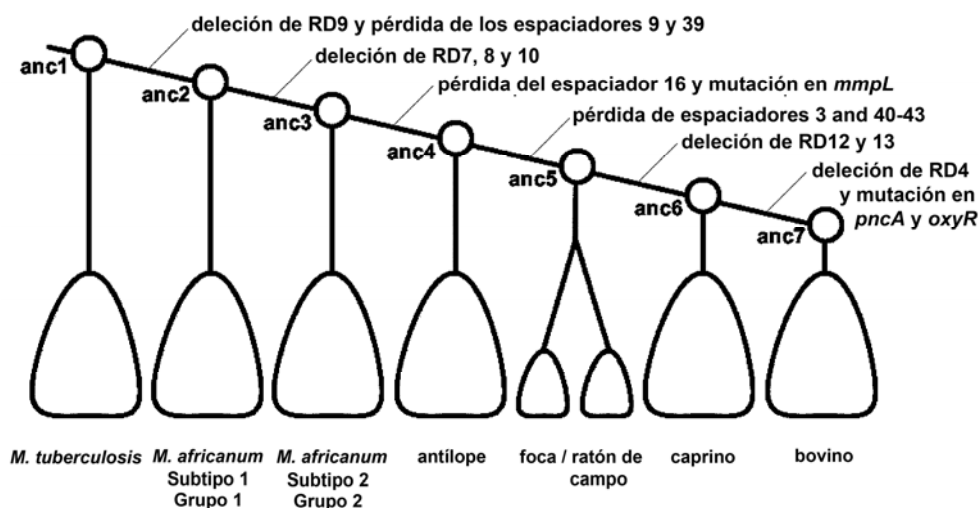


**Figura 3.** Esquema del proceso de evolución del bacilo tuberculoso. Se ilustra la pérdida de ADN de los diferentes linajes. El esquema está basado en la presencia o ausencia de regiones RD conservadas y en los polimorfismos de cinco genes (adaptado de Brosch *et al.*, 2002)

Otros estudios realizados en estas regiones RD han permitido la diferenciación de las distintas variantes de la cepa vacunal *M. bovis* BCG (Mostowy *et al.*, 2003). Todas las variantes carecen de la región RD1, faceta que las diferencia de la cepa patógena de *M. bovis*. Además, de forma adicional han ido perdiendo otras regiones RD (RD2, RD14, RD16, entre otras), a medida que se han subcultivado y mantenido en las distintas instituciones.

A parte de las regiones DR, la presencia o ausencia de ciertos espaciadores en la región *Direct Variable Repeat*, DVR (ver apartados 6.3.1 y 6.5.5, Locus DR y Espoligotipado, respectivamente) ha aportado información filogenética suficiente para generar un nuevo escenario de evolución de MTBC (Smith *et al.*, 2006b). Algunos estudios de la región DVR en cepas de *M. tuberculosis* han concluido que su tendencia es la pérdida de uno o varios espaciadores contiguos (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000). Por ello la presencia o ausencia de estos espaciadores se ha usado como marcadores filogenéticos del mismo modo que la pérdida de RDs, siendo este análisis congruente con la filogenia generada mediante el estudio de los RDs. A diferencia del cladograma descrito previamente (Brosch *et al.*, 2002), Smith y colaboradores establecieron una serie de cepas ancestrales intermedias que describen al ancestro previo a cada uno de los linajes

(Figura 4). Todo el linaje con el RD9 deleciónado también tiene ausencia de los espaciadores 9 y 39, incluyendo la falta del espaciador 16 en la subespeciación a partir del ancestro 3 (*M. africanum*, subtipo 1, grupo 2). La evolución a partir del ancestro 4 dio lugar a la pérdida de los espaciadores 3, y del 40 al 43. A diferencia de la información aportada por Brosch y colaboradores, Smith diversifica en dos ramas a los descendientes del ancestro 5, dependiendo del hospedador: una que afectaba principalmente a las focas (*M. pinnipedii*) y otra los ratones de campo (*M. microti*). Estos dos subgrupos pueden ser distinguidos mediante el perfil de espigotipado y deleciones específicas de ciertas regiones cromosómicas (Ahmed *et al.*, 2003; Frota *et al.*, 2004; García-Pelayo *et al.*, 2004). Smith y colaboradores introdujeron un nuevo concepto de evolución basado en ecotipos o linajes adaptados a un determinado hospedador, que se correspondería con las especies descritas en MTBC. Aunque el concepto de ecotipos no existe de forma estricta para los miembros de MTBC, estos surgen cuando una especie evoluciona y es capaz de adaptarse a un nuevo nicho/hospedador y llega a ser inmune a los procesos de selección (barrido selectivo mediante selección natural) en la población ancestral (Cohan, 2002; Smith *et al.*, 2006a).



**Figura 4.** Filogenia del linaje RD9 deleciónado y *M. tuberculosis* con las regiones deleciónadas (RDs), polimorfismos de un único nucleótido y la pérdida de espaciadores usados para la definición de los grupos. Los ancestros hipotéticos, anc1-anc7, se muestran en círculos (adaptado de Smith *et al.*, 2006b)

En la actualidad la teoría de la transmisión de la enfermedad del hombre a los animales es la más plausible. Sin embargo, es improbable que la cepa original de la tuberculosis bovina –la primera cepa que causó tuberculosis bovina–, derivase directamente de la cepa humana. Para determinar la dirección de la transmisión recientemente ha sido evaluada la adaptación al hospedador del primer linaje con la región RD9 deleciónada: subtipo 1 de *M. africanum* (Figura 4). Si esta especie es capaz de mantenerse en el hombre, la parsimonia sugiere que todos los linajes adaptados a las diversas especies animales evolucionaron de una cepa que estaba

adaptada previamente al hombre. Como la localización geográfica de *M. africanum* es el continente africano, es posible que también esté allí el origen de los linajes animales (Smith *et al.*, 2009b).

### 3. TUBERCULOSIS EN ANIMALES CAUSADA POR *M. bovis*/*M. caprae*

El agente etiológico de la tuberculosis en animales por excelencia es *M. bovis*. Desde la puesta en marcha de los planes de erradicación de esta enfermedad en el ganado bovino, el término tuberculosis bovina ha estado asociado a la enfermedad producida por *M. bovis* en esta especie animal. Según el subgrupo de trabajo europeo de tuberculosis bovina (*task force*), la definición de la tuberculosis bovina es "la infección en ganado bovino producida por cualquier miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*" (Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force, 2006). Aunque esta definición se centra únicamente en ganado bovino, los hallazgos de la infección en otras especies animales y la elevación a especie de algunas cepas de MTBC llevaron a generalizar este término a la infección producida por cualquiera de los miembros de MTBC en los animales. Del mismo modo, muchos autores usan el término de tuberculosis bovina cuando la especie afectada es el hombre y el agente etiológico es *M. bovis*. Además, esta enfermedad está considerada por la OIE (*Office International des Epizooties*) como una enfermedad de gran importancia, incluida en su lista única de enfermedades de declaración obligatoria ([http://www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification2009.htm?e1d7](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2009.htm?e1d7)).

El ganado caprino es la segunda especie principalmente afectada, siendo *M. caprae* el agente causal mayoritario de la enfermedad (O'Reilly y Daborn, 1995; Aranaz *et al.*, 2003; Erler *et al.*, 2004). Aunque la prevalencia es desconocida en estos animales se especula que es elevada debido a la ausencia de programas de erradicación en la mayoría de las Comunidades Autónomas (Aranaz *et al.*, 1996a; Liébana *et al.*, 1998; Cadmus *et al.*, 2009). La prevalencia de la tuberculosis causada por *M. bovis* en la ganadería porcina, tanto en intensivo como en extensivo, y en la ganadería ovina, también se desconoce aunque debido al escaso número de hallazgos se presume baja (Aranaz *et al.*, 1996a; Malone *et al.*, 2003). Además hay que destacar los escasos hallazgos en ovejas y, por ello, se presume una resistencia de esta especie a la infección por *M. bovis*/*M. caprae* (Malone *et al.*, 2003; Marianelli *et al.*, 2010). Los animales peridomésticos (perros, gatos) también se han visto afectados por la tuberculosis bovina debido al contacto directo con las explotaciones ganaderas y sus propietarios (Snider, 1971; Aranaz *et al.*, 1996b; Ellis *et al.*, 2006; Monies *et al.*, 2006; Dean *et al.*, 2006; Une y Mori, 2007; Shrikishna *et al.*, 2009; Zumárraga *et al.*, 2009). Por otro lado, la presencia de la infección en las poblaciones de animales salvajes se está estudiando minuciosamente desde los años 90. Algunas especies ya han sido consideradas reservorios de la infección, por lo que podrían estar teniendo una gran relevancia en las campañas de erradicación y control de la tuberculosis en el ganado bovino. Estos animales reservorio son principalmente el tejón en Reino Unido y la República de Irlanda, el venado de cola blanca en Estados Unidos, la zarigüella en Nueva Zelanda, el búfalo en África y el jabalí en España (Delahay *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2003; Aranaz *et al.*, 2004a; Michel *et al.*, 2006; Palmer, 2007; Naranjo *et al.*, 2008) (ver apartado 3.2, Tuberculosis en animales de vida libre).



### 3.1. Distribución e impacto económico

La tuberculosis bovina es una zoonosis de distribución mundial, que presenta grandes variaciones en su prevalencia entre distintos países. Aunque en los países más desarrollados está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de erradicación, en los países en desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica. En Europa occidental, Canadá y Estados Unidos, la infección se ha reducido a niveles inferiores al 0,1 % (Reviriego Gordejo y Vermeersch, 2006; United States Department of Agriculture, 2009; Wobeser, 2009; Koller-Jones, 2010). Centro América, con excepción de Nicaragua y el Caribe, tiene porcentajes de animales afectados muy bajos (menos del 1%) (Abalos y Retamal, 2004; de Kantor y Ritacco, 2006), mientras que Cuba está libre de la enfermedad (Abdala, 1998). Los mayores niveles de infección se encuentran en América del Sur (de Kantor y Ritacco, 2006), en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia, con prevalencias del 1% o superiores, siendo las cuencas lecheras las más afectadas (Cosivi *et al.*, 1998).

La enfermedad en el ganado genera una disminución de la productividad y, por ello, las pérdidas tienen una relación directa con la prevalencia. Esta enfermedad causa aproximadamente una disminución en un 10-20% de la producción lechera y cárnica (Bennett y Cooke, 2006; Boland *et al.*, 2010), y una disminución de un 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños; todo ello unido a la restricción en la venta y/o exportación de carne proveniente del animal (Council Directive 64/432/EEC).

Dentro de la Comunidad Europea, la situación relativa a la tuberculosis bovina y su principal agente causal, *M. bovis*, difiere según los países. En el informe anual de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) de 2008 sobre las tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos de la Unión Europea, aparecen los 11 países miembros (Member States, MS) calificados como libres de tuberculosis bovina (*officially tuberculosis-free*, OTF) (Bélgica, República Checa, Dinamarca, Alemania, Francia, Luxemburgo, Holanda, Austria, Eslovaquia, Finlandia y Suecia), 2 países no miembros (Noruega y Suiza), así como 16 provincias y 3 regiones de Italia (European Food Safety Authority, 2010) (Figura 5).

El resto de países considerados como no libres de tuberculosis (*non-officially tuberculosis-free*, non-OTF) (Portugal, España, Reino Unido, Irlanda, Eslovenia, Hungría, Rumanía, Bulgaria, Grecia, Malta, Chipre, Polonia, Lituania, Letonia y Estonia) presentan diversas prevalencias de esta infección, siendo Irlanda y Reino Unido las de mayor prevalencia (5,97 y 2,88%, respectivamente) (Figura 6). La erradicación se define como la consecución de no más de 0,1% de rebaños bovinos infectados por año durante 6 años consecutivos, y que al menos el 99,99% de los rebaños sean oficialmente libre durante esos 6 años consecutivos.

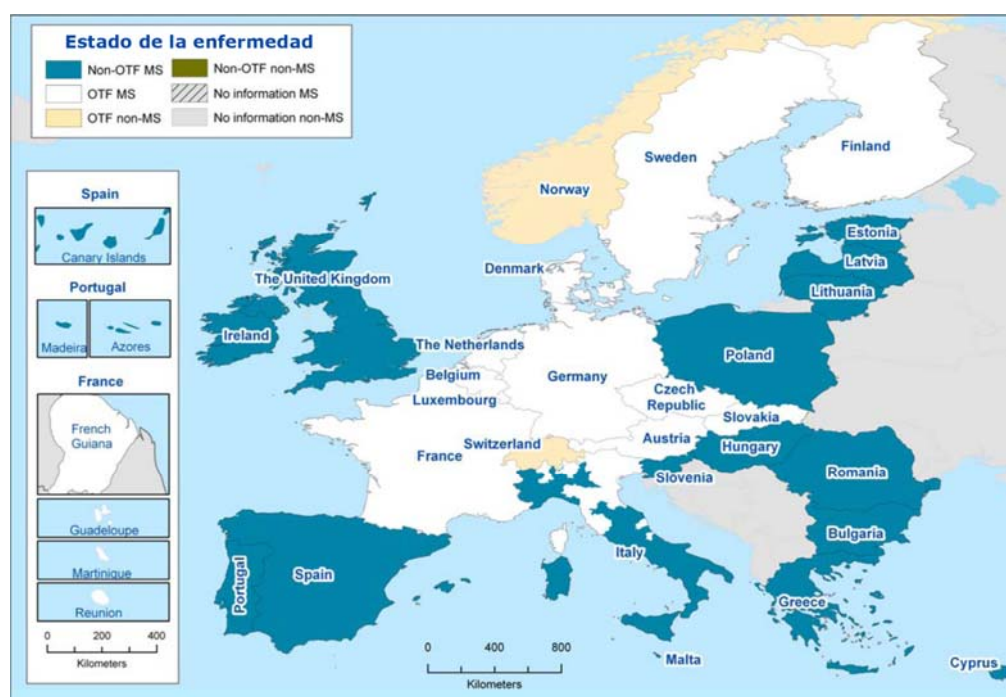
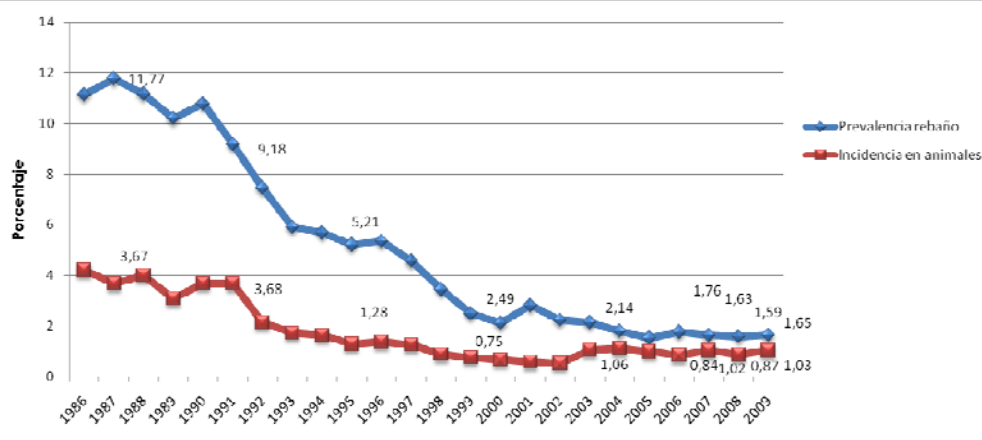


Figura 5. Estado de la tuberculosis bovina en los estados miembros en el año 2008



Figura 6. Proporción de rebaños infectados por *M. bovis* en 2008, datos expresados por países

La prevalencia de rebaño en España durante los últimos 20 años ha tenido un descenso sostenido pero moderado. El descenso fue más acusado en los primeros 12 años, entrando en una fase asintótica en la que se han intensificado las medidas tomadas en los programas de erradicación (intradermotuberculinización y el test de detección de interferón gamma), situándose en el año 2009 en 1,65% (Figura 7).



**Figura 7.** Prevalencia de rebaño e incidencia en animales con tuberculosis bovina, 1986-2009 (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino)

Esta prevalencia presenta grandes variaciones dependiendo de las Comunidades Autónomas, siendo Castilla-La Mancha, Andalucía, Madrid, Extremadura y Murcia las que presentan valores más altos, y Baleares y Canarias, Asturias, Galicia y Navarra las de menor prevalencia (Tabla 2). De forma general se puede decir que hay mayores prevalencias en la parte sur y centro del país, mientras que la cornisa cantábrica y el levante presentan una menor presencia de la enfermedad. Esta variabilidad puede explicarse teniendo en cuenta varios parámetros: 1) condiciones climáticas: la prevalencia es mayor en zonas más secas y calurosas, ya que esto favorece la agregación de animales en los puntos para beber y, con ellos, la diseminación de la enfermedad; 2) condiciones productivas: en el norte y este de España se concentra el ganado de aptitud lechera, en el que las prevalencias de la enfermedad son menores; por el contrario, en el sur y en la meseta hay un mayor porcentaje de ganado de carne, cuyo saneamiento fue posterior al de leche, y por ello presenta unas prevalencias de tuberculosis superiores. Además, una alta proporción de explotaciones de carne se explotan en régimen extensivo, en ocasiones en zonas de difícil acceso, son razas autóctonas de manejo complicado, y que pueden estar compartiendo pastos con otras especies (por ejemplo caprina) que pueden actuar como reservorios de la enfermedad; 3) fauna salvaje: la existencia de otras especies de vida salvaje pueden actuar como reservorios (principalmente jabalí y ciervo) (Aranaz *et al.*, 2004a; Gortázar *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2006; Martín-Hernando *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2008), encontrándose en densidades muy superiores en la mitad sur del país (Vicente *et al.*, 2007). Todo esto puede explicar la mayor lentitud en el avance del programa de erradicación nacional en estas regiones.

**Tabla 2.** Prevalencia de rebaño de tuberculosis bovina por CCAA en el periodo 2002-2009 (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino)

Comunidad Autónoma	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Andalucía	9,65	8,47	6,73	5,32	5,76	4,15	5,80	8,94
Aragón	3,14	2,75	2,03	1,56	1,96	3,65	0,75	0,70
Asturias	0,32	0,22	0,24	0,18	0,17	0,24	0,22	0,21
Baleares	0,92	1,02	0,65	0,65	0,22	0,21	0,00	0,00
Canarias	0,34	1,05	2,40	1,00	0,36	0,37	0,24	0,00
Cantabria	1,00	1,34	1,41	1,16	1,05	2,25	1,57	0,91
Castilla-La Mancha	7,69	3,36	7,19	7,02	7,71	9,51	11,62	10,27
Castilla y León	5,10	5,66	3,78	3,37	5,11	4,16	3,71	2,75
Cataluña	1,93	1,74	1,78	1,70	1,65	1,08	0,85	0,83
Extremadura	7,45	5,95	5,57	4,05	4,84	3,74	3,37	3,78
Galicia	0,52	0,43	0,46	0,31	0,20	0,19	0,11	0,22
La Rioja	2,05	2,70	2,76	1,31	0,72	0,70	1,45	0,75
Madrid	3,69	3,92	1,99	2,58	2,59	3,41	5,72	5,54
Murcia	5,79	1,48	7,59	4,46	4,96	8,05	3,29	3,51
Navarra	0,52	0,82	0,36	0,38	0,27	0,33	0,40	0,30
País Vasco	0,06	0,17	0,22	0,64	0,19	0,14	0,20	0,57
Valencia	12,47	5,56	2,63	2,16	1,61	1,14	1,41	1,38
<b>TOTAL</b>	<b>2,24</b>	<b>2,14</b>	<b>1,80</b>	<b>1,52</b>	<b>1,76</b>	<b>1,63</b>	<b>1,59</b>	<b>1,65</b>

### 3.2. Tuberculosis en animales de vida libre

La tuberculosis bovina en animales salvajes ha sido descrita en todo el mundo. Sin embargo, el riesgo que estos animales suponen para otras especies, incluyendo el hombre, es variable entre países y depende de las diversas condiciones epidemiológicas y medioambientales. Los miembros de MTBC, principalmente *M. bovis*, han sido aislados en una amplia gama de especies animales tales como búfalos, bisones, cabras, caballos, camellos, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, cudús, elanes, tapires, alces, elefantes, sitatungas, órices, addaxes, rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo o el lince, entre otros. Las consecuencias que tiene esta infección en animales salvajes se centran en tres aspectos fundamentales: 1) el papel de estas especies como reservorio de la infección para los animales domésticos; 2) la morbilidad y mortalidad que la infección puede causar en la población salvaje, especialmente en las especies protegidas y en peligro de extinción, y 3) el posible impacto en Salud Pública.

Históricamente el ganado bovino ha sido considerado el verdadero hospedador de *M. bovis*, aunque también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales domésticos y de vida libre. Ambos grupos pueden ser considerados tanto reservorios (*maintenance host*), o no reservorios (*spillover host*) de la tuberculosis bovina (Morris y Pfeiffer, 1995). En los animales considerados reservorios, la infección persiste en la

especie afectada sin ninguna fuente de reinfección externa, y pueden también ser la fuente de infección de otras especies animales. Los reservorios son críticos en la epidemiología y control de la enfermedad ya que, si no se interviene, la enfermedad persistirá entre la población. En un hospedador no considerado reservorio, la infección no persiste indefinidamente a menos que haya una reinfección por parte de otras especies (domésticos o salvajes). Sin embargo, en muchas ocasiones *M. bovis* se ha transmitido del ganado bovino a una especie salvaje susceptible mediante una especie *spillover*. El hospedador *spillover* puede ser considerado el hospedador final y no tener implicación en la transmisión de la enfermedad, o puede actuar como hospedador transmisor de la misma a otras especies animales salvajes o volver a los animales domésticos (*spillback*). Por lo tanto, tanto el reservorio como el hospedador *spillover* pueden actuar como vectores de la enfermedad (Palmer, 2007). Estos dos conceptos son importantes cuando se plantea el control de la enfermedad y el seguimiento de la infección en una especie una vez que la infección ha sido eliminada o está en vías de erradicación.

El papel de los animales salvajes en el mantenimiento y transmisión de la infección por *M. bovis* al ganado representa un problema en el control de la infección en Europa (Wilson *et al.*, 2009). La tuberculosis bovina tiene particular importancia en los países donde los programas de erradicación han reducido substancialmente la incidencia de tuberculosis en ganado bovino pero donde la enfermedad persiste y ocurren nuevos brotes. Los ejemplos más conocidos de reservorios de tuberculosis en animales salvajes en Europa son el tejón europeo (*Meles meles*) en Reino Unido y la República de Irlanda (Gallagher y Clifton-Hadley, 2000; Delahay *et al.*, 2002), y el jabalí (*Sus scrofa*) en España (Aranaz *et al.*, 2004a; Naranjo *et al.*, 2008). Otros ejemplos son la zarigüella (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda (Tweddle y Livingstone, 1994; Ryan *et al.*, 2006), el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Estados Unidos (O'Brien *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2006), el alce o ciervo canadiense (*Cervus elaphus manitobensis*) y el bisón (*Bison bison athabasca*) en Canadá (Nishi *et al.*, 2006; Wobeser, 2009), y el búfalo cafre (*Syncerus caffer*) en África (Michel, 2002; Michel *et al.*, 2006).

En algunos casos la tuberculosis bovina tiene un gran impacto en el bienestar animal y en la conservación de la biodiversidad, viéndose afectada la supervivencia de especies en peligro de extinción (Daszak *et al.*, 2000; McCallum y Hocking, 2005; Littin y Mellor, 2005). La presencia de *M. bovis* genera un aumento en la morbilidad y mortalidad en las poblaciones de animales salvajes. Este evento puede tener efectos catastróficos en la conservación de pequeñas especies protegidas en los que la muerte de un individuo podría representar la pérdida de la especie. En Europa, la escasa población del protegido lince ibérico (*Lynx pardinus*) podría estar en peligro debido a la vulnerabilidad de esta población a la tuberculosis bovina, incluyendo otras causas de mortalidad (Briones *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001b; Aranaz *et al.*, 2004a). Estos carnívoros pueden infectarse mediante el consumo de carcasas infectadas. La infección por MTBC también ha sido descrita en otros felinos salvajes, como el león (*Panthera leo*) y el guepardo (*Acionyx jubatus*) en África (de Vos *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2006) o el gato montés (*Felix rufus*) en Estados Unidos (Bruning-Fann *et al.*, 2001).

El último punto a tener en cuenta en lo que respecta a los animales salvajes es su posible implicación como fuente de infección en humanos, ya que esta enfermedad se trata de una zoonosis. Existe el riesgo de transmisión por contacto directo entre los animales infectados y los cazadores o manipuladores, así como también por consumo de sus derivados cárnicos (Fanning y Edwards, 1991; Wilkins *et al.*, 2008). En lo referente al contacto directo, existe riesgo de contagio en el personal que maneja animales infectados o sus carcasas mediante la contaminación por aerosoles cuando las carcasas están abiertas, o mediante la entrada del agente patógeno a través de cortes en la piel o vía oral por escasas medidas higiénicas (Wilkins *et al.*, 2003; de la Rua-Domenech, 2006; Wilkins *et al.*, 2009). Además hay que tener en cuenta que los animales cazados se suelen destinar al consumo humano y la carne de animales infectados puede contener micobacterias viables que representan un riesgo para los consumidores, de forma particular cuando la carne se come cruda. Todo este riesgo de infección se reduce considerablemente al hacer una inspección post-mortem para detectar lesiones compatibles con la tuberculosis y eliminar los órganos afectados.

La prevalencia de la tuberculosis bovina en animales de vida libre se desconoce en muchas ocasiones ya que, a pesar de las encuestas llevadas a cabo en el campo y la inspección de las carcasas, este parámetro únicamente se evalúa cuando la especie animal es considerada como reservorio de la infección. Por lo tanto, la recogida de datos normalmente recae sobre las distintas fuentes de información asociadas a los animales muertos por envenenamiento o caza, atropellos y hospitalizaciones de animales. Sin embargo, sí que se ha estimado la prevalencia de la infección para las especies ya definidas como reservorios, aunque hay que tener en cuenta la posible variación en la sensibilidad de las distintas técnicas usadas para su evaluación.

Debido a que los tejones se consideran el principal reservorio de vida libre en Reino Unido y la República de Irlanda, únicamente existen datos sobre su prevalencia en estos países aunque la infección también ha sido identificada en esta especie animal en Suiza (Bouvier *et al.*, 1957) y España (Sobrino *et al.*, 2008). Los datos sobre tuberculosis bovina en tejones han sido recogidos en las zonas sur y oeste de Reino Unido, donde las prevalencias de tuberculosis en vacas son más altas. Sin embargo, son escasos los estudios realizados en las áreas con reducidos brotes de tuberculosis bovina, por lo que se desconoce la prevalencia en estas zonas. En el informe redactado en 2007 por Bourne y colaboradores, la prevalencia de tuberculosis en tejones eliminados sobre 10 zonas de alta prevalencia de tuberculosis bovina en domésticos, al sur de Inglaterra, oscilaba entre el 2% y el 37% (Bourne *et al.*, 2007), y en la República de Irlanda la prevalencia en tejones en cuatro zonas fue 19,5% (Griffin *et al.*, 2005).

La infección en jabalíes está muy extendida en Europa, habiéndose descrito tanto en países libres o como no libres de tuberculosis. En los últimos 10 años varios artículos han confirmado la infección en Hungría (Machackova *et al.*, 2003; Erler *et al.*, 2004; Pavlik, 2006), Croacia (Pavlik *et al.*, 2002), Francia (Haddad *et al.*, 2001; Zanella *et al.*, 2008a; Zanella *et al.*, 2008b), Alemania (Schultz *et al.*, 1992), Italia (Serraino *et al.*, 1999; Boniotti *et al.*, 2009), Portugal (Duarte *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009), Eslovaquia (Machackova *et al.*, 2003) y España (Aranaz *et al.*, 2004a; Hermoso

de Mendoza *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2008). La mayor parte de los estudios proceden de los países mediterráneos y su prevalencia en jabalíes varía entre el 1% al 52%, observándose los valores más altos en el sur de la Península Ibérica (Wilson *et al.*, 2009). Estudios recientes realizados en el centro-sur de España entre 1992 y 2008 muestran prevalencias de tuberculosis en jabalíes entre el 3% y el 52%, basándose en la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2006) o el aislamiento del agente causal mediante cultivo microbiológico (Aranaz *et al.*, 2004a; Romero *et al.*, 2008; Gortázar *et al.*, 2008). De especial reseña son los estudios realizados en el Parque Nacional de Doñana, al sur de España, ya que se han realizado muestreos en dos periodos sucesivos, hecho que ha permitido la comparación de prevalencias. Durante los años 1998-2003 la prevalencia de la tuberculosis observada en jabalíes en el Parque Nacional de Doñana fue del 28% mientras que en el estudio realizado en 2006-2007 ésta prácticamente se duplicó (Gortázar *et al.*, 2008). Aunque la mayoría de los estudios realizados en la Península Ibérica señalan al jabalí como reservorio de la tuberculosis bovina (Aranaz *et al.*, 2004a; Martín-Hernando *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009), otros estudios italianos han sugerido al jabalí como hospedador final de *M. bovis*, basándose en la localización de las lesiones en los linfonodos de la cabeza (Serraino *et al.*, 1999).

La tuberculosis en cérvidos ha sido descrita en varias especies en Estados Unidos, Canadá y Europa. Aunque los principales reservorios estudiados son el ciervo de cola blanca y el alce en América del Norte, en Europa aún se cuestiona su papel como reservorio de la infección. *M. bovis* ha sido aislado de cérvidos en Reino Unido (Delahay *et al.*, 2007), España (Aranaz *et al.*, 2004a; Vicente *et al.*, 2006), Irlanda (Quigley *et al.*, 1997), Austria (Glawischnig *et al.*, 2003), Suiza (Bouvier, 1963), Hungría (Pavlik, 2006), Portugal (Duarte *et al.*, 2008), Francia (Zanella *et al.*, 2008a), y Dinamarca (Clausen y Korsholm, 1991), entre otros. La prevalencia de esta enfermedad en Europa puede ser alta pero varía dependiendo de la región entre el 1% y el 27%. Por ejemplo, en Inglaterra se identificó la infección en un 1,02% de la población muestreada (Delahay *et al.*, 2007), viéndose incrementada de un 13% a un 24% en la Bretaña francesa a pesar de las medidas de control llevadas a cabo para esta especie. En España, la infección está distribuida en la población silvestre de ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*), siendo Castilla-La Mancha, Extremadura y Andalucía las comunidades más afectadas (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2006; Gortázar *et al.*, 2008). La prevalencia en estas áreas oscila entre el 1,74% y el 27%.

### 3.3. Tuberculosis en el ganado bovino producido por *M. tuberculosis*

Durante años, la tuberculosis en animales producida por *Mycobacterium tuberculosis* ha sido considerada insignificante debido principalmente a dos motivos: 1) la enfermedad causada por *M. bovis* es clínica y patológicamente indistinguible de la causada por *M. tuberculosis* y 2) la dificultad de diferenciar/identificar ambas especies, especialmente en los países carentes de la metodología necesaria. Además, el riesgo de transmisión de *M. tuberculosis* del hombre a los animales se considera despreciable, ya que este bacilo no está adaptado a los animales. Sin embargo, este riesgo se establece sobre la base de la prevalencia de la infección en

humanos: mayor riesgo cuanto mayor sea la prevalencia de esta infección en el hombre. Por eso, la mayor parte de los hallazgos de tuberculosis humana en animales se ha producido en los continentes africano y asiático (Prasad *et al.*, 2005; Cadmus *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; World Health Organization, 2009; Fetene *et al.*, 2009). En Europa se han descrito pocos casos de tuberculosis humana en animales, estando en su mayoría encuadrados en los países del este (Pavlik *et al.*, 2003; Pavlik *et al.*, 2005).

En animales domésticos, la infección con el bacilo humano fue descrita a principios del siglo pasado, al encontrarse lesiones en ganado bovino expuesto a los efluentes y residuos de hospitales destinados al tratamiento de enfermos con tuberculosis (Kraus, 1942). Aunque la infección por *M. tuberculosis* parece haber sido despreciable, el número de casos en vacas parece estar aumentando recientemente (Cadmus *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Este aumento pudiera ser debido a una mejora en el diagnóstico mediante el uso de técnicas de diagnóstico y moleculares y/o al actual aumento en el contacto y la transmisión entre los humanos y el ganado en estos países. Según el informe de 2009 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el control global de la tuberculosis en humanos, la incidencia durante este año ha aumentado en India, China, Indonesia, Nigeria, Sudáfrica, Banglades, Etiopía y Paquistán (World Health Organization, 2009). Este hecho, unido a la intensificación en la producción de las ganaderías en algunos países en vías de desarrollo, ha dado lugar a un mayor riesgo de transmisión tanto de *M. tuberculosis* como de *M. bovis* entre el hombre y el ganado.

Algunos estudios han revelado que la prevalencia de la infección por *M. tuberculosis* en ganado bovino no excede el 1% (Pavlik *et al.*, 2003; Ocepek *et al.*, 2005; Cadmus *et al.*, 2006; Une y Mori, 2007), aunque las técnicas de diagnóstico no permiten en muchos casos una correcta identificación del agente patógeno (Ayele *et al.*, 2004). En África, sin embargo, países como Algeria y Sudán presentan una prevalencia del 6,2% y del 7,4%, respectivamente. En un estudio realizado en leche en Etiopía, Fetene y colaboradores aislaron *M. tuberculosis* en 15,4% de las muestras (Fetene *et al.*, 2009). Estos valores podrían ser el resultado de la alta prevalencia de tuberculosis humana en los tres países (Dye, 2006; Dye *et al.*, 2009). El estudio realizado por Regassa y colaboradores indicó que la prevalencia de tuberculosis en las vacas causada por *M. tuberculosis* fue tres veces superior cuando el personal de la explotación presentaba una tuberculosis activa que cuando la infección era latente (Regassa *et al.*, 2008). Del mismo modo, Prasad y colaboradores en India mostraron una altísima tasa de incidencia de *M. tuberculosis* en ganado bovino (30,8%) mediante la técnica de PCR anidada (Prasad *et al.*, 2005). En China, también ha sido aislado este patógeno en explotaciones ganaderas, identificándose *M. tuberculosis* en un 15,8% (6/38) de los animales infectados (Chen *et al.*, 2009). Además, las técnicas de caracterización molecular (ver apartados 6.5.5 y 6.5.6, Espoligotipado y Análisis de las repeticiones en tándem de múltiples loci, respectivamente) aportaron información sobre la coincidencia de perfiles en estos animales y los perfiles más prevalentes en la población humana de la zona. En Europa occidental únicamente existe constancia de la infección por *M. tuberculosis* en ganado bovino en Reino Unido en la década de los años 50, donde se detectó la infección en un total de



cinco explotaciones (Lesslie, 1960). *M. tuberculosis* también ha sido aislado e identificado como agente causal de la tuberculosis en otras especies animales como las cabras en Nigeria (Cadmus *et al.*, 2009) y los cerdos en Egipto, Bosnia, Noruega, Inglaterra, Alemania, Eslovaquia, Polonia (Pavlik *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2009).

Entre los factores que favorecen las condiciones de transmisión del hombre a los animales se encuentran la proximidad y la frecuencia de contacto entre ambos. Por lo tanto, la infección causada por *M. tuberculosis* ocurre con más frecuencia en animales que están en contacto directo con los humanos, siendo los animales que están en cautividad los que presentan un mayor riesgo de contagio (Montali *et al.*, 2001). Durante las últimas décadas se han descrito por todo el mundo bastantes casos de tuberculosis en elefantes de zoológicos o granjas exóticas, hallándose en todos los casos una fuente de infección humana (Michalak *et al.*, 1998; Davis, 2001; Oh *et al.*, 2002; Payeur *et al.*, 2002; Lewerin *et al.*, 2005). La infección por *M. tuberculosis* también ha sido descrita en animales de compañía, especialmente en perros. En un estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores, *M. tuberculosis* fue aislado de un 75% de los perros con tuberculosis y en más de un 88% de los casos hubo un contacto con pacientes con una tuberculosis activa (Liu *et al.*, 1980). Otros animales de compañía como los pájaros (psitácidas principalmente) (Schmidt *et al.*, 2008) y monos (Alfonso *et al.*, 2004; Une y Mori, 2007) también pueden infectarse por este patógeno. En alguna ocasión la aparición de la enfermedad en estos animales de compañía es un reflejo de la enfermedad en la población que les rodea y en ocasiones conlleva al diagnóstico de la enfermedad en sus dueños (Hawthorne y Lauder, 1962; Erwin *et al.*, 2004). Por otra parte, la transmisión de *M. tuberculosis* entre especies animales también se puede dar, como fue el caso de contagio entre elefantes y jirafas de un zoo de Suecia (Lewerin *et al.*, 2005).

Aunque es un hallazgo poco común, también se ha descrito la infección tuberculosa en un mismo animal producida por dos especies del complejo *M. tuberculosis*. En un estudio de tuberculosis realizado en la India sobre una única explotación observaron 52 animales infectados (92,8%). Mediante una PCR anidada identificaron los agentes etiológicos, aislando *M. bovis* en el 28,8% de las muestras, *M. tuberculosis* en el 30,8%, y ambas especies (infección mixta) en un 38,5% (Prasad *et al.*, 2005).

### 3.4. Patogénesis

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad, natural o producida experimentalmente, están influenciadas por varios factores como son: 1) la ruta de infección o inoculación, 2) los factores derivados del hospedador, principalmente la calidad de la respuesta inmune desarrollada, 3) la virulencia de la cepa de microorganismo, y 4) la dosis recibida (Neill *et al.*, 1994).

Debido a que la transmisión se produce principalmente por vía aerógena, la exposición a los aerosoles está considerada como la ruta más frecuente para la infección de los animales (Menzies y Neill, 2000). Sin embargo, la infección por la ingesta de material contaminado también puede ocurrir. En este caso, la infección por vía oral puede ser más probable en unas condiciones de clima templado que permitan la diseminación y la supervivencia de *M. bovis* en los pastos (Goodchild y

Clifton-Hadley, 2001). El hallazgo de lesiones intestinales no es frecuente en los países en los que los programas de erradicación aseguran la eliminación de los animales tuberculosos antes de la diseminación del microorganismo. La infección cutánea es bastante rara en animales y se debe a la contaminación de lesiones primarias con las micobacterias, y suele limitarse al punto de entrada y al ganglio linfático regional.

Otros factores como la edad del animal o su comportamiento o el sistema de producción influyen en patogénesis de la enfermedad. En general, los animales jóvenes desarrollan lesiones más severas que los adultos (Martín-Hernando *et al.*, 2007). Además, la enfermedad es más frecuente en vacas lecheras debido al hacinamiento, y un mayor periodo de vida y estrés productivo (Ramírez-Villaescusa *et al.*, 2010). Sin embargo, los rebaños de producción cárnica pueden verse afectados con alta morbilidad si entran animales infectados y comparten el mismo bebedero.

La virulencia de las cepas depende de una serie de complejas interacciones entre los microorganismos y el hospedador (Collins, 2001). Los bacilos contienen unos factores de virulencia, algunos de ellos asociados a los lípidos de la pared celular, que le permiten contrarrestar las defensas del hospedador, multiplicándose en el punto de entrada antes de su diseminación a otros órganos. Cuanto más virulenta sea una cepa, más tiempo continuará creciendo en el pulmón, aunque comience una resistencia en otros órganos.

La dosis de infección también afecta a la distribución y severidad de las lesiones. La dosis mínima de infección depende en gran medida de la ruta de infección. En numerosos estudios realizados en cobayas la infección por vía oral requiere dosis infectivas muy superiores a las requeridas por mediante los aerosoles. De hecho, dosis tan bajas de 1-5 bacilos pueden producir infección mediante la vía respiratoria (Neill *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2007), mientras que se necesitan del orden de  $10^6$  bacilos para producir la enfermedad por vía oral (Francis, 1947). Por otra parte es importante señalar que en algunas ocasiones la bacteria permanece en estado latente en el organismo hospedador sin desencadenar la enfermedad.

Es importante reseñar los conceptos de animal infectado y animal enfermo. Un animal infectado es aquel que ha estado en contacto en algún momento con las micobacterias incluidas en MTBC y que, debido a ello, su sistema inmunológico responde frente a los antígenos de estos patógenos en una segunda exposición, por ejemplo al realizar la intradermotuberculinización. Un animal enfermo es aquel que presenta sintomatología y/o lesiones compatibles con la tuberculosis y, por lo tanto, puede estar excretando el bacilo y transmitiendo la infección a otros animales. La reacción de un animal a las pruebas inmunológicas indica infección y no necesariamente desarrollo de la enfermedad.

#### **3.4.1. Sintomatología clínica y lesiones**

La sintomatología clínica y las lesiones de esta infección dependen en cierta medida de la vía de transmisión de la misma. De este modo, si la infección se ha producido por vía aerógena estarán principalmente afectados los órganos y linfonodos asociados al aparato respiratorio; mientras que si la vía es oral las lesiones se producirán en localizaciones extrapulmonares.

El bacilo tuberculoso una vez dentro del animal, puede diseminarse en dos etapas: una tuberculosis primaria y, posteriormente, una tuberculosis secundaria (período de diseminación post-primaria). La **tuberculosis primaria** comprende la lesión inicial en el órgano que actúa como puerta de entrada siendo éste el foco primario. Posteriormente o simultáneamente los bacilos drenan por vía linfática a los ganglios linfáticos regionales donde se origina el mismo tipo de lesión. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el ganglio linfático regional constituye el complejo primario. Un ejemplo es el complejo primario pulmonar: el bacilo penetra en los pulmones, se multiplica y se disemina en los mismos, produciendo una lesión en forma de tubérculo, infectando al mismo tiempo los nódulos linfáticos bronquiales. La **tuberculosis secundaria** incluye el periodo de diseminación post-primario. Al verse afectado el sistema inmunológico del animal, los bacilos dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; la diseminación de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso. En el caso de la diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen sobre todo en los pulmones, riñones, hígado y bazo. Las lesiones más frecuentes suelen darse en los pulmones y en los linfonodos retrofaríngeo, traqueobronquial, y mediastínico.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la sintomatología clínica varía con la distribución de las lesiones en el organismo. La tuberculosis suele presentar una evolución dilatada en el tiempo y los síntomas pueden tardar meses o años en aparecer. Los signos clínicos varían en función de la localización de las lesiones. En el caso de hallarse en el pulmón se manifiesta con tos seca intermitente que podría estar inducida por cambios de temperatura o la presión en la tráquea, así como neumonía. En estados avanzados de la enfermedad existe engrosamiento de los linfonodos que podrían obstruir el paso del aire, el tracto alimentario u oprimir los vasos sanguíneos. Otros síntomas habituales son la debilidad, pérdida de apetito y de peso, fiebre fluctuante, tos seca intermitente, diarrea y ganglios linfáticos grandes y prominentes. En los países sometidos a los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, la sintomatología clínica se encuentra rara vez en la ganadería bovina ya que el uso del test de la intradermotuberculinización permite un diagnóstico presuntivo y elimina los animales infectados antes de la aparición de signos clínicos. En los años previos a la implantación de los programas de erradicación, era frecuente observar la sintomatología asociada con la tuberculosis (Vestal, 1975).

En el ámbito veterinario las lesiones se ven con más frecuencia en los linfonodos bronquial, mediastínico, retrofaríngeo y portal, y pueden ser los únicos tejidos afectados. Además, los pulmones, el hígado, el bazo y otras cavidades suelen estar afectadas. Al realizar la necropsia, la apariencia de un granuloma tuberculoso suele ser amarillenta y caseosa, calcificada o presentar una combinación de ambas. El tamaño de las lesiones varía desde un tamaño imperceptible al ojo humano y la implicación de una gran parte del órgano. Por ello, el seccionado de los órganos implicados es esencial para detectar las lesiones contenidas en el tejido (Office International des Epizooties, 2009).

### 3.5. Diagnóstico

El diagnóstico actual de la tuberculosis se basa fundamentalmente en la detección directa del agente etiológico (mediante cultivo microbiológico o detección de su ADN), y la detección indirecta mediante la determinación de la respuesta inmune desencadenada por la infección.

#### 3.5.1. Detección directa del agente etiológico

##### 3.5.1.1. Cultivo bacteriológico

El diagnóstico bacteriológico se considera la prueba de referencia (*gold standard*) y debe emplearse siempre para la confirmación de la infección en un rebaño. Para el aislamiento de las micobacterias pertenecientes a MTBC debe tenerse en cuenta que se trata de microorganismos con un crecimiento lento y, por lo tanto, el proceso de recuperación es lento y tedioso. Por ello, es necesario seguir un protocolo que permita la recuperación selectiva de estos microorganismos, ya que la mayoría de las muestras contienen también otras bacterias de crecimiento rápido que pueden alterar el pH, modificar con sus enzimas la composición de los medios y enmascarar con su crecimiento el de las micobacterias. Además, no todas poseen los mismos requerimientos nutritivos y, por ende, es necesario el uso de medios específicos.

Según el Manual de Procedimiento para la Toma y Envío de Muestras para el Cultivo Microbiológico de Tuberculosis, basado principalmente en la directiva 64/432/ECC y en los artículos de divulgación, el material patológico idóneo para la confirmación de la tuberculosis son los nódulos linfáticos y órganos parenquimatosos anómalos, tales como el pulmón, hígado o el bazo. Si existen lesiones compatibles con tuberculosis debe recogerse la lesión/es incluyendo tejido sano adyacente, tanto de los linfonodos como de los órganos parenquimatosos anómalos. Cuando el animal no presente lesiones patológicas es importante recoger para su examen y cultivo bacteriológico al menos un linfonodo de cada uno de las siguientes localizaciones: cabeza (retrofaríngeo y mandibular), cavidad torácica (mediastínico y bronquial), miembro torácico (cervical superior o preescapular), cavidad abdominal (mesentérico o hepático), y glándula mamaria (supramamarios).

Tras un examen macroscópico de las muestras que permita comprobar si existen lesiones compatibles con tuberculosis se realiza un troceado de los linfonodos recibidos, seguido de su homogenización. Debido al crecimiento lento de las micobacterias incluidas en MTBC es necesario realizar un proceso de descontaminación de las muestras para evitar la contaminación de los medios de cultivo. Aprovechando la resistencia de las micobacterias a determinados compuestos químicos existe la posibilidad de usar distintos productos como por ejemplo el ácido oxálico al 5% (Tacquet y Tison, 1961), el hidróxido de sodio (NaOH) al 2-4% (Corner y Trajstman, 1988) o combinado con laurilsulfato sódico (Mankiewicz y Demuet, 1970; Corner y Nicolacopoulos, 1988) y el cloruro de hexadecilcetilpiridinio (HPC) (Corner y Trajstman, 1988). El tiempo de exposición y concentración de todos ellos debe ser cuidadosamente controlado, debido a que la resistencia de las

micobacterias no es absoluta. Por ejemplo, el HPC se usa a una concentración final del 0,35%. Tras una agitación de la muestra con el descontaminante durante 30 minutos y una centrifugación (1068 g), el sedimento se siembra en medios de cultivo específicos.

Los medios de cultivo sólido más empleados contienen una base de yema de huevo [Lowenstein-Jensen, LJ (Stonebrink, 1958), Coletsos (Grange *et al.*, 1996) y Stonebrink (Rüsch-Gerdes *et al.*, 1985; Goh y Rastogi, 1991; Carbonnelle *et al.*, 1995)]. Todos estos medios incluyen glicerol, compuesto requerido para el crecimiento de *M. tuberculosis* pero que *M. bovis* no puede usar para su crecimiento (Kanchana *et al.*, 2000; Hines *et al.*, 2006). La secuenciación del genoma de *M. bovis* reveló una mutación en el gen que codifica la piruvato kinasa, enzima que cataliza el paso final irreversible de la glicolisis (fosfoenolpiruvato a piruvato) (Keating *et al.*, 2005). Por lo tanto, la fuente de energía para esta especie no procede de la glucosa sino de los aminoácidos o ácidos grasos. Para suplir esta deficiencia enzimática y favorecer el crecimiento de *M. bovis*, el piruvato sódico ha sido incorporado a los medios de cultivo (Keating *et al.*, 2005).

En la actualidad existen diversos sistemas de cultivo líquido automatizados que reducen ostensiblemente el tiempo de cultivo, incrementándose también en gran medida la sensibilidad de la técnica de cultivo. Uno de los primeros sistemas empleados para el aislamiento de cepas del complejo *M. tuberculosis* fue el sistema radiométrico BACTEC 460 system (Becton Dickinson Inc.), un medio líquido que detecta las variaciones en las concentraciones de CO<sub>2</sub>, producto de la respiración bacteriana, mediante un sistema de detección de <sup>14</sup>C (Williams-Bouyer *et al.*, 2000; LaBombardi, 2002). Otros sistemas automatizados no radiométricos empleados para el aislamiento de MTBC son MB/BACT (Organon Teknika, Boxtel, Holanda), BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Inc.) (Hanna *et al.*, 1999; Hines *et al.*, 2006), y ESP culture system II [VersaTREK Myco, Cleveland, OH, EE.UU. (comúnmente ESP Culture System, Difco, Detroit, EE.UU.)] (Hines *et al.*, 2006). Desde la aparición de estos sistemas automatizados se han desarrollado varios estudios que comparan la capacidad de recuperación de micobacterias de MTBC a partir de muestras clínicas, mediante los sistemas convencionales (medios sólidos) y los sistemas automatizados (medios líquidos). Hines y colaboradores compararon la recuperación ofrecida por el método radiométrico BACTEC 460 y no radiométrico MGIT 960, con la ofrecida por el sistema convencional con el descontaminante hipoclorito e hidróxido de sodio y los medios de cultivo sólidos Middlebrook 7H10 y 7H11 (Hines *et al.*, 2006). La sensibilidad del MGIT fue 94,6%, del BACTEC 460 un 79,1%, y del método convencional en medio sólido fue de un 74,4%. El tiempo medio de detección fue de 15,8 días para el sistema MGIT 960, 28,2 días para el BACTEC 460, y 43,4 días para los medios sólidos. Otros muchos estudios también han mostrado que la sensibilidad de los sistemas líquidos automatizados es superior a los medios sólidos (Somoskovi *et al.*, 2000; Alcaide *et al.*, 2000), aunque recomiendan el uso de algún medio sólido para aumentar la recuperación de micobacterias, principalmente aquellas no incluidas en MTBC (Hanna *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002; Sorlozano *et al.*, 2009).

Los inconvenientes de estos sistemas de cultivo respecto al cultivo tradicional en medios sólidos son su mayor tasa de contaminación, su elevado coste económico y la necesidad de realizar una extracción posteriormente del crecimiento obtenido en

el medio líquido. Esta extracción puede resultar más tediosa que un simple hervido de colonias crecidas en un medio sólido. La identificación se realiza por tanto mediante métodos moleculares (más rápido, pero más caro) o haciendo subcultivo en medio sólido (más barato, pero más lento). Sin embargo, recientemente se ha publicado un estudio con la relación de beneficio-coste del sistema líquido MGIT 960 y el precio estimado para los sistemas líquidos no es muy superior a los métodos basados en medios sólidos, incidiendo en la importancia de obtener un resultado en el menor tiempo posible (Mueller *et al.*, 2008).

### 3.5.1.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador

En la actualidad las pruebas de diagnóstico oficial de la tuberculosis en el ganado bovino en España son la intradermotuberculinización (IDTB) simple y la IDTB comparada (Real Decreto 2611/1996, anexo 1). La primera consiste en la inoculación de un derivado proteico purificado (tuberculina o PPD) preparado a partir de la cepa de *M. bovis* AN5. El fundamento de la prueba se basa en que, si esa tuberculina se inyecta en un animal que ha estado en contacto previo con *M. bovis*, su sistema inmune provoca una reacción inflamatoria en el punto de inoculación que alcanza la máxima intensidad a las 48-72 horas post-inyección, y que desaparece poco después. Por el contrario, si se somete a este test un animal no infectado, no se observa reacción aparente.

En el caso de animales que hayan sido expuestos a otras micobacterias, por ejemplo micobacterias ambientales que también presentan algunas de las proteínas incluidas en el derivado proteico (PPD), éstos pueden dar una respuesta positiva en la prueba diagnóstica. Por ello se puede emplear la prueba de la IDTB comparada o de comparación (Real Decreto 2611/1996, anexo 1, modificado por el RD 1047/2003). En esta prueba se inyecta simultáneamente en dos localizaciones separadas la PPD bovina y otra PPD preparada a partir de cepas de *Mycobacterium avium* (PPD aviar). Posteriormente se miden y comparan las respuestas inflamatorias a ambas tuberculinas, siendo un animal negativo aquel que, a pesar de responder a la PPD bovina, presentara una respuesta a la PPD aviar igual o mayor. En España su uso está contemplado en rebaños oficialmente indemnes pertenecientes a Comunidades Autónomas de prevalencia de rebaño inferior al 1% o a ciertas unidades veterinarias con prevalencias inferiores al 1% situadas en Comunidades con prevalencias superiores.

Otra alternativa diagnóstica es el test de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Dicho test mide la producción de IFN- $\gamma$  producida por los linfocitos estimulados con la PPD bovina *in vivo*, comparándola normalmente con la producción al realizar la estimulación con PPD aviar (Wood *et al.*, 1990; Rothel *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1991; Rothel *et al.*, 1992). Esta prueba ha demostrado una gran sensibilidad y es capaz de detectar animales infectados en fases iniciales de la enfermedad (Gormley *et al.*, 2006) pero tiene un menor especificidad (Vordermeier *et al.*, 2006). En la actualidad, tanto en la legislación europea como en la nacional se contempla el empleo de este test como prueba diagnóstica complementaria en paralelo con la IDTB para la detección del máximo número de animales infectados (Directiva Europea 64/432/EEC, modificada por ED 1226/2002 del 8 de julio 2002). Su uso está restringido a

determinadas circunstancias, como por ejemplo a la prevalencia de la infección en el rebaño.

### 3.6. Identificación

Varias décadas atrás la identificación de los miembros de MTBC se realizaba mediante métodos convencionales que incluían numerosas pruebas bioquímicas (ver apartado 2.1, tabla 1, Complejo *M. tuberculosis*). Sin embargo, gracias a los avances en la biología molecular la identificación del género *Mycobacterium* y de MTBC se basa en las secuencias de ADN específicas. Estas dianas se amplifican mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*) y visualizadas en geles de agarosa o mediante la PCR a tiempo real. Otro método empleado para la identificación de los miembros de MTBC es la presencia/ausencia de mutaciones puntuales en varios genes del metabolismo celular (Sreevatsan *et al.*, 1997a; Espinosa de los Monteros *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 2000; Niemann *et al.*, 2000a; Brosch *et al.*, 2002) (Tabla 3).

La principal diana específica de las micobacterias (género *Mycobacterium*) es el gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico. Sin embargo, existen otras dianas para la identificación de este género como son el gen *recA* que interviene en la recombinación de ADN, en la reparación de los errores y en la inducción de la respuesta SOS (Blackwood *et al.*, 2000); o el gen *rpoB*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la enzima ARN polimerasa. Este último gen está flanqueado por unas secuencias conservadas, lo que permite el uso del mismo par de oligonucleótidos para todas las especies de micobacterias (Lee *et al.*, 2000).

En lo que respecta a la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* existen varias dianas como el gen que codifica la proteína MPB70, MPB40 o las secuencias de inserción IS6110 ó IS1081 (ver apartado 6.1, Secuencias de inserción). La detección de las distintas regiones de diferenciación (RDs) también permite distinguir de una forma muy fiable las especies pertenecientes a MTBC.

#### 3.6.1. Gen que codifica el ARN ribosómico

Las secuencias del ARN ribosómico (ARNr) están altamente conservadas entre los procariotas, observándose regiones menos conservadas en la evolución de las micobacterias y que son objetivos potenciales para sondas específicas de género o de especie (Böddinghaus *et al.*, 1990). Sin embargo, la secuencia del ARNr no permite diferenciar entre las distintas especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis* (Glennon *et al.*, 1994).

Dentro de la secuencia que codifica la subunidad 16S del ARNr existen varias regiones diferenciadas. Algunas presentan identidad nucleotídica incluyendo las especies pertenecientes al grupo *Corynebacterium-Nocardia-Actinomyces*; y otras regiones están perfectamente conservadas en todas las especies de micobacterias y no aparecen en otros microorganismos (Böddinghaus *et al.*, 1990), por lo que los oligonucleótidos complementarios a estas secuencias pueden ser utilizados como iniciadores para amplificaciones específicas de género.

Tabla 3. Polimorfismos de un sólo nucleótido que diferencia a las principales especies del complejo *M. tuberculosis*

Especie	Variedad	* <i>katG</i> <sup>443</sup>	<i>gyrA</i> <sup>95</sup>	<i>gyrB</i>					<i>oxyR</i> <sup>285</sup>	<i>pncA</i> <sup>57</sup>	<i>mmpL6</i> <sup>551</sup>
				675	756	1311	1410	1450			
<i>M. tuberculosis</i>	Clásica	CGG (Arg) CTG (Leu)	AGC(Ser) ACC (Thr)	C	G	T	C	G	G	CAC (His)	AAC (Asn)
	Tipo I	CTG	ACC	C	G	T	C	T	G	CAC	AAC
<i>M. africanum</i>	Tipo II	CTG	ACC	C	G	T	C	G	G	CAC	AAC
	-	CTG	ACC	T	G	T	C	T	G	CAC	AAG (Lys)
<i>M. microti</i>	-	CTG	ACC	T	G	T	C	T	G	CAC	AAG
<i>M. pinnipedii</i>	-	CTG	ACC	T	G	T	C	T	G	CAC	AAG
<i>M. caprae</i>	-	CTG	ACC	C	A	G	C	T	A	CAC	AAG
	Bovina clásica	CTG	ACC	C	A	T	T	T	A	GAC (Asp)	AAG
<i>M. bovis</i>	BCG	CTG	ACC	C	A	T	T	T	A	GAC	AAG

\* El superíndice en cada gen se refiere a la posición del codón (*katG*, *gyrA*, *pncA*, *mmpL6*), o a la posición del nucleótido (*oxyR*, *gyrB*)



La combinación de éstos con un iniciador complementario de una secuencia común del ARNr 16S produce un tamaño de banda esperado en presencia de ADN de micobacterias. Este método ha sido utilizado para la identificación de colonias obtenidas de cultivos (Wilton y Cousins, 1992) y para el diagnóstico de tuberculosis a partir de muestras clínicas humanas. Los iniciadores MYCGEN-F, oligonucleótido universal 246, y MYCGEN-R, inverso y complementario de la secuencia 264, específica de las micobacterias (Böddinghaus *et al.*, 1990), amplifican un fragmento de 1.030 pares de bases.

### 3.6.2. Gen que codifica la proteína MPB70

La proteína de secreción MPB70 fue aislada por primera vez a partir de *M. bovis* BCG (Nagai *et al.*, 1981) y es uno de los antígenos de micobacterias más estudiados y más importante en las preparaciones de PPD (derivado de proteína purificada) de *M. bovis*. Además, tiene una alta homología con proteínas de los otros miembros de MTBC. Esta proteína tiene una alta expresión por parte de *M. bovis* a diferencia de los aislados de *M. tuberculosis*.

El gen que codifica la proteína MPB70, de 673 nucleótidos, está incluido en un operón de seis genes. El gen *mpb70* codifica una proteína precursora de péptidos de señal para ser exportados posteriormente. La expresión de este gen está controlada por el regulador transcripcional SigK, y una mutación en este regulador explica que ciertas cepas de *M. bovis* BCG expresen una cantidad mínima de esta proteína (Charlet *et al.*, 2005).

### 3.6.3. Regiones de diferenciación, RD

En los años previos a la publicación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, Mahairas y colaboradores detectaron tres RDs (RD1, RD2 y RD3) que estaban ausentes en la cepa vacunal BCG comparándola con una cepa virulenta de *M. bovis* (Mahairas *et al.*, 1996). Este hallazgo fue el inicio del uso de estas regiones para el diagnóstico laboratorial de MTBC y sus especies. El diseño de una PCR con tres oligonucleótidos, dos situados fuera del RD y otro dentro del mismo, ha sido la base para detectar la presencia/ausencia de los RDs y, por lo tanto, la identificación de las especies de MTBC (Talbot *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 2002). Todos los organismos *M. tuberculosis sensu stricto* contienen la región RD9, mientras que todos los *M. bovis* se caracterizan por carecer de RD4 (ver apartado 2.11, figuras 3 y 4, Evolución del complejo *M. tuberculosis*). Entre estos extremos existen otros organismos que carecen de RD9 pero presentan la región RD4, como son *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae* (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002). Estudios posteriores revelaron otras deleciones que permitieron identificar a los organismos como *M. canettii* (Brosch *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005), *M. africanum* (Mostowy *et al.*, 2004b), *Dassie bacillus* (Mostowy *et al.*, 2004a), *M. pinnipedii* (Brosch *et al.*, 2001; Mostowy *et al.*, 2005), o *M. caprae* (Mostowy *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la utilidad de las RDs en la identificación de los miembros de MTBC se suma a su uso en los estudios filogenéticos de los organismos de MTBC, previamente comentado (ver apartado 2.11, Evolución del complejo *M. tuberculosis*).

#### 4. TUBERCULOSIS EN HUMANOS CAUSADA POR *M. bovis*/*M. caprae*

El principal agente causal de la tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis*, y en menor medida *M. bovis* y *M. caprae*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, de los cuales alrededor de un 5-10% desarrolla la enfermedad y excreta el bacilo, constituyendo un nuevo foco de infección. Se calcula que en 2007 hubo 9,27 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales 7,9 millones se produjeron en Asia y África subsahariana (World Health Organization, 2009). En ese mismo año, esta enfermedad infecciosa causó 1,8 millones de muertes, motivo por el cual la tuberculosis sigue siendo una enfermedad de gran relevancia para la Salud Pública. De especial importancia resultan los casos de coinfección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la tuberculosis, ya que ambos patógenos actúan de forma sinérgica incrementando la patogenicidad del otro. Así, la tuberculosis es la causa más común de mortalidad en adultos infectados por el VIH en países en vías de desarrollo.

Aunque la tuberculosis causada por *M. bovis* es comparativamente poco frecuente, especialmente en países desarrollados (Grange, 2001), la tuberculosis bovina se considera una enfermedad zoonótica de gran relevancia, y por ello se realizan grandes esfuerzos y se dedican recursos a su control. La infección por *M. bovis* en humanos fue importante a finales del siglo XIX y principios del XX, y supuso una proporción considerable de tuberculosis en Europa. Por ejemplo, debido a la alta prevalencia de la infección en el ganado bovino en Gran Bretaña (15-20%) en la década de los años 30, se estimó que alrededor de un 6% de las muertes en el hombre debidas a la tuberculosis estaban causadas por *M. bovis* (Hardie y Watson, 1992). Gracias a la instauración de la pasteurización y los programas de erradicación en el ganado bovino, que incluye la inspección en los mataderos, los casos de tuberculosis en humanos causados por *M. bovis* disminuyeron (de la Rua-Domenech, 2006). En las dos últimas décadas en los países desarrollados, la infección humana causada por esta bacteria ha supuesto una pequeña proporción (0,5-10%) de todos los pacientes con tuberculosis con un diagnóstico confirmado mediante bacteriología (Sauret *et al.*, 1992; Cosivi *et al.*, 1998; Cousins y Dawson, 1999; Robert *et al.*, 1999; Collins, 2000; Ashford *et al.*, 2001; Pavlik *et al.*, 2004; Thoen *et al.*, 2006; Mignard *et al.*, 2006; Rodwell *et al.*, 2008). Sin embargo, la infección por *M. bovis* en países en vías de desarrollo representa una mayor amenaza para la Salud Pública. A esto se le suma que, con independencia del agente causal de la tuberculosis, la enfermedad en humanos es clínica, radiológica y patológicamente indistinguible. Por este motivo *M. bovis* y *M. tuberculosis* sólo se pueden diferenciar mediante métodos de diagnóstico sofisticados. Este hecho dificulta o imposibilita en muchos países estimar con precisión la proporción de los casos de tuberculosis humana producidos por *M. bovis*, aunque es muy probable que sea mayor que en los países industrializados (Cosivi *et al.*, 1998; Ayele *et al.*, 2004). Algunos autores han especulado que esta bacteria podría estar produciendo entre un 10-15% del total de 7-10 millones de casos nuevos de tuberculosis en estas regiones (Cosivi *et al.*, 1998; Ashford *et al.*, 2001).

En el último informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) y el Sistema de Vigilancia Europea (*The European Surveillance System*, TESSy), el número de casos de tuberculosis bovina en humanos durante el año 2008 fue 113, lo que supone al menos un 0,2% del total de casos de tuberculosis (*European Food Safety Authority*, 2010; *European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe*, 2010). Según los datos recogidos en este mismo informe, la prevalencia de *M. bovis* en humanos en España también es 0,2%, con un total de 11 casos durante este periodo (Tabla 4). Estos datos resultan inferiores a los publicados previamente en el estudio realizado entre los años 1986-1990 en un hospital de Barcelona (Sauret *et al.*, 1992). Dichos autores informan de una incidencia de 0,9% de *M. bovis* en relación al total de casos de tuberculosis. En base a los datos recogidos por el Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias en España durante los años 2004 y 2007, se identificaron 89 aislados humanos de *M. bovis*, que representan el 1,9% del total de aislados del CMTB enviados a este Centro desde los distintos hospitales (Rodríguez *et al.*, 2009).

En base a los datos aportados por Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias y aquellos recogidos por el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (Tabla 4), el porcentaje de aislados identificados como *M. bovis* varía de un 1,9% en el periodo comprendido entre 2004-2007 a un 0,2% en 2008. A pesar de no estar hablando de los mismos años, esta gran diferencia en los datos sobre la tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* requiere un análisis más detallado. Este hecho podría tener dos causas: 1) el envío de los aislados de MTBC de forma voluntaria al Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias y, por lo tanto, una posible falta de notificación al laboratorio central, que desconocía de forma precisa el total de casos de tuberculosis en ese momento; y 2) la información remitida al Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades no identifica la especie en el 72,7% de los aislados que produjeron la enfermedad en humanos, por lo que pudiera ser que la identificación de los mismos se realice a posteriori en España.

**Tabla 4.** Aislamientos de *M. bovis* y casos totales de tuberculosis en humanos notificados al Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades, 2008.

Región	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. africanum</i>		MTBC		Total cultivos positivos
	N	%	N	%	N	%	N	%	N
<b>España</b>	1206	<b>26,8</b>	11	<b>0,2</b>	8	<b>0,2</b>	3268	<b>72,7</b>	<b>4463</b>
<b>EU/EEA*</b>	40252	<b>84,7</b>	113	<b>0,2</b>	60	<b>0,1</b>	7072	<b>14,9</b>	<b>47497</b>

\*EU/EEA: comprende los 27 países miembros de la Unión Europea junto con Noruega, Islandia y Liechtenstein.

En España son de especial importancia los brotes de tuberculosis en humanos causados por una cepa multirresistente (MDR, *multidrug-resistant*) de *M. bovis* en la década de los 90 (Rullán *et al.*, 1996; Guerrero *et al.*, 1997; Rivero *et al.*, 2001) y que posteriormente ha producido casos esporádicos durante el siglo XXI (Robles *et al.*,

2002; Ramos *et al.*, 2004). La importancia de este brote radicó principalmente en su elevada mortalidad.

Otro de los posibles agentes causales de la tuberculosis en el hombre es *M. caprae* (Gutiérrez *et al.*, 1997; Kubica *et al.*, 2003; Blaas *et al.*, 2003; Prodinger *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2005; Pavlik, 2006), principal causante de la tuberculosis en cabras, aunque también en ganado vacuno y otros animales salvajes (Aranaz *et al.*, 1996a; Prodinger *et al.*, 2002; Pavlik, 2006). Los estudios realizados de aislados de *M. caprae* en humanos están encuadrados principalmente en los países del centro-este de Europa (Erler *et al.*, 2004; Prodinger *et al.*, 2005; Cvetnic *et al.*, 2007) ya que el número de aislados de *M. caprae* en animales es alto en estos países y, por ende, aumenta la probabilidad de transmisión al hombre. En Alemania se cree que *M. caprae* es responsable de un tercio de los casos de tuberculosis en humanos asociados a *M. bovis* (Kubica *et al.*, 2003). Otros estudios epidemiológicos realizados con cepas procedentes de Alemania, República Checa, Croacia y Hungría, aisladas de animales domésticos y salvajes, señalan la posible relación con los aislados humanos (Erler *et al.*, 2004; Cvetnic *et al.*, 2007). Algunos de los genotipos identificados son compartidos por los animales y el hombre, sugiriendo una posible vía de transmisión. Por otro lado, en regiones calificadas libres de tuberculosis, como el oeste de Australia, se han producido varios brotes de esta enfermedad en ganado vacuno y en cérvidos (Prodinger *et al.*, 2002). Estos hechos han impulsado la realización de estudios de prevalencia y caracterización molecular en animales y en el hombre, encontrando las mismas cepas de *M. caprae* en animales domésticos y en humanos con un contacto estrecho con estas ganaderías.

En España las publicaciones científicas relacionadas con la infección en humanos por *M. caprae* son escasas. Según Gutiérrez y colaboradores, *M. caprae* fue el agente causal de la tuberculosis en tres personas entre 1994-1996, encontrando un vínculo epidemiológico entre los pacientes y el ambiente rural, o la dedicación profesional de los mismos (inspector de matadero o veterinario de campo) (Gutiérrez *et al.*, 1997). Recientemente, un estudio retrospectivo realizado entre los años 2004 y 2007 ha revelado que la prevalencia la tuberculosis en humanos producida por *M. caprae* es del 0,3% (Rodríguez *et al.*, 2009). Este aumento puede ser debido a una identificación de la especie causante de la enfermedad que anteriormente no se realizaba.

#### 4.1. Rutas de transmisión

Las principales vías de transmisión de los miembros de MTBC al hombre son la inhalación de aerosoles, la ingestión de alimentos, o el contacto directo con las mucosas o heridas en la piel. La incidencia de la tuberculosis zoonótica asociada a estas vías de transmisión depende en gran medida de la eficacia de los programas de vigilancia y control de la tuberculosis en ganado bovino, de las medidas higiénicas en la manipulación de alimentos, e incluso del estatus sanitario y social de la población.

#### 4.1.1. Transmisión respiratoria

La tuberculosis es fundamentalmente una enfermedad respiratoria y la transmisión de la infección se produce en general por vía aerógena. En el caso concreto de *M. bovis*, el principal riesgo existe para el personal que maneja o está en contacto de forma regular con reservorios de *M. bovis* o sus carcasas. Por ello, los grupos más expuestos a este tipo de transmisión son, entre otros, los ganaderos, veterinarios, inspectores de carne, matarifes, cazadores, cuidadores de zoos y reservas, y el personal de laboratorio (O'Reilly y Daborn, 1995; Grange, 2001; LoBue, 2006).

Otro grupo expuesto a la tuberculosis bovina es el formado por todas aquellas personas que presentan un estado de supresión del sistema inmune, siendo el ejemplo más claro los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Debido a ello, el elevado impacto de la pandemia del sida en la epidemiología de la tuberculosis bovina en humanos es un tema de preocupación actual. Aunque la mayoría de los pacientes de tuberculosis en Europa son de edad avanzada la enfermedad también se ha descrito en niños portadores de virus de la inmunodeficiencia humana (Dankner *et al.*, 1993).

Aunque la transmisión directa de la tuberculosis bovina entre personas puede ocurrir, algunos autores han sugerido que la transmisión de la tuberculosis causada por *M. bovis* es un evento excepcional en ausencia de inmunosupresión (Grange, 2001; LoBue, 2006). Se han descrito algunos casos de transmisión de *M. bovis* sensible entre individuos infectados con VIH y pacientes alcohólicos (Dankner *et al.*, 1993; Rivero *et al.*, 2001). El mayor y más reciente brote de tuberculosis por *M. bovis* ocurrió en España a principios de los años 90, confirmándose la transmisión por vía aerógena (Guerrero *et al.*, 1997; Palenque *et al.*, 1998; Rivero *et al.*, 2001). Este brote se caracterizó por estar causado por una cepa multirresistente (MDR, *multidrug-resistant*) a once antibióticos. La multirresistencia se define cuando una cepa es resistente al menos a la isoniazida y rifampicina. El primer brote nosocomial se detectó en un hospital de Madrid en 1991 (Rullán *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1996) y posteriormente, la epidemia se extendió a otros hospitales de la zona (Guerrero *et al.*, 1997; Blázquez *et al.*, 1997; Palenque *et al.*, 1998; Cobo *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2004), Málaga (Rivero *et al.*, 2001), Zaragoza (Solano *et al.*, 2003), Cádiz y Valencia (Samper *et al.*, 2005), acumulándose un total de 111 casos en 5 años. Además varios brotes de esta misma cepa aparecieron en distintas ciudades europeas (Samper *et al.*, 1997) y en Estados Unidos (Long *et al.*, 1999). La importancia de este brote radicó en su elevada mortalidad (cercana al 100%) debido a que casi la totalidad de los pacientes estaban infectados por el virus del sida. Otros casos de coinfección de la tuberculosis y el VIH han sido descritos (Valencia *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2007).

En 2007, Evans y colaboradores describieron un brote de tuberculosis en seis pacientes; tras realizar un estudio de contactos sugirieron la transmisión entre personas, ya que todos ellos tenían en común algunos hábitos sociales (Evans *et al.*, 2007). Más recientemente, se han hallado dos casos de transmisión de *M. bovis* entre dos pacientes inmunodeprimidos de la misma familia (Sunder *et al.*, 2009). También existen evidencias de transmisión de la tuberculosis por *M. bovis* entre los miembros de una familia, sin presentar algún tipo de inmunosupresión. Tal fue el caso descrito en

Argentina de posible transmisión de la enfermedad producida por *M. bovis* multirresistente entre un padre y una hija (Etchehoury *et al.*, 2009).

#### 4.1.2. Transmisión oral

Históricamente, el consumo de **leche** no pasteurizada o sus derivados procedente de vacas infectadas se consideró el principal vehículo para la infección en humanos (Dankner y Davis, 2000; LoBue *et al.*, 2003; Rodwell *et al.*, 2008; Levison, 2008). Tras una reducción de la prevalencia de la tuberculosis en vacuno mediante el uso de las técnicas diagnósticas y la inspección en el matadero, unido a la obligatoriedad de la pasteurización de la leche este riesgo se redujo (Centers for Diseases Control and Prevention, 2005). A pesar de ello, en las dos últimas décadas uno de los principales puntos de mira relacionados con la tuberculosis producida por *M. bovis* recae sobre la reemergencia de esta enfermedad debido a los inmigrantes procedentes de regiones donde la tuberculosis bovina tiene una alta prevalencia. Los ejemplos más claros se han descrito en la frontera de Estados Unidos y México (Ej. San Diego, California) (Dankner *et al.*, 1993; Dankner y Davis, 2000; Besser *et al.*, 2001; LoBue *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2003; Lobue *et al.*, 2004; Hlavsa *et al.*, 2008; de Kantor *et al.*, 2008; Milian-Suazo *et al.*, 2008), o en zonas de mayor porcentaje de inmigrantes en la población (Ej. Nueva York) (Rodwell *et al.*, 2008). El análisis realizado mediante el estudio de la edad y ciertos grupos étnicos, unido al uso de la epidemiología clásica y molecular, ha asociado el origen de las infecciones con la ingesta de leche cruda o sus derivados, como el queso fresco (Rodwell *et al.*, 2008). Además varios de estos estudios también encontraron una asociación entre la coinfección de la tuberculosis por *M. bovis* y el VIH, aunque no en mayor medida que entre la infección producida por *M. tuberculosis* y VIH (Dankner *et al.*, 1993; Robert *et al.*, 1999; Rodwell *et al.*, 2008). Estudios recientes realizados en San Diego han mostrado que un 8% de los casos de tuberculosis entre 1994 y 2005 fueron debidos a *M. bovis* (265 *M. bovis* de 3291 casos de tuberculosis); de éstos, el 96% de los casos de tuberculosis se aislaron de gente de etnia hispana. Sorprendentemente, el 45% de todos los casos de tuberculosis en niños (entre uno y 15 años) estuvo causado por *M. bovis*; el aislamiento de *M. bovis* en los niños con una edad inferior a un año no es frecuente debido al uso de leche materna (Rodwell *et al.*, 2008). Por otro lado hoy todavía se registran casos de tuberculosis por *M. bovis* en personas mayores debido a una reactivación de la infección latente adquirida años atrás (Dankner *et al.*, 1993; O'Reilly y Daborn, 1995; Robert *et al.*, 1999).

Otro vehículo de transmisión oral es la **carne** y sus derivados. La carne cruda o poco cocinada procedente de animales infectados con tuberculosis podría ser otra vía de transmisión de la enfermedad. Sin embargo, las evidencias existentes atribuibles a la ingesta de carne de animales tuberculosos son prácticamente inexistentes (Francis, 1973; Grange y Yates, 1994; Moda *et al.*, 1996; Ashford *et al.*, 2001). La transmisión de *M. bovis* al hombre no se ha producido en muchas décadas desde que están instaurados los programas de vigilancia y control de la enfermedad en animales. Aún en el caso de que la carne tuviera *M. bovis* se sabe que este organismo es bastante sensible al tratamiento térmico. Además la ingestión es una ruta de transmisión de la tuberculosis mucho menos eficaz que la respiratoria ya que requiere miles de bacilos viables para iniciar la infección (O'Reilly y Daborn, 1995).

#### 4.1.3. Transmisión cutánea y por mucosas

En la actualidad este tipo de transmisión es extremadamente rara en los países desarrollados. En el pasado, la transmisión cutánea o por mucosas se localizó en piel, tendones o linfonodos con lesiones, causando otitis y conjuntivitis en el personal en contacto directo con la leche, así como en el personal que normalmente manejaban las carcasas de los animales con tuberculosis, y veterinarios expuestos durante las necropsias o intervenciones quirúrgicas (Pritchard, 1988; Moda *et al.*, 1996). Algunos de los casos observados recientemente incluyen al personal que está en contacto directo con las carcasas de animales infectados, como son los cazadores (Wilkins *et al.*, 2003; Wilkins *et al.*, 2008) o los inspectores de mataderos (Liss *et al.*, 1994; Grange, 2001).

#### 4.2. Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento de la tuberculosis en los animales no está permitido y se aplica de forma excepcional en algunos casos en animales peridomésticos (Hackendahl *et al.*, 2004). A pesar de ello, y teniendo en cuenta el carácter zoonótico de esta enfermedad, los animales son el principal reservorio de la tuberculosis producida por *M. bovis*/*M. caprae* en humanos. La importancia de cualquier tratamiento radica en la eficacia del mismo y ésta puede verse truncada con la aparición de resistencias antimicrobianas a los fármacos empleados. Sin embargo, para descartar a los animales como fuente de resistencias es importante realizar un seguimiento de la sensibilidad antibiótica de los aislados.

A diferencia de otras infecciones bacterianas, el tratamiento de la tuberculosis en el hombre tiene en cuenta el tiempo de generación prolongado de los miembros de MTBC y su capacidad de entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos (Telenti, 1998). Respecto al tratamiento existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización (pulmonar, macrófagos o *caseum*) y actividad (multiplicación activa o latencia). Por otra parte, la capacidad de penetración de los antibióticos difiere dependiendo de la localización: mayor capacidad en los tejidos y menor en cavidades pulmonares, pus o material caseoso. Además hay que destacar que el pH del material caseoso y del interior de los macrófagos es muy bajo, lo cual condiciona la actividad de ciertos fármacos. Por todo ello, los fármacos antituberculosos presentan un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones.

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos por el hecho de poseer una pared compleja y muy hidrófoba. La tuberculosis tiene un tratamiento eficaz, que asegura una tasa de curación superior al 95%, si no existen complicaciones. El éxito del tratamiento se basa en la asociación de fármacos y en su larga duración: isoniacida (hidracina del ácido isonicotínico, INH), rifampicina (RIF) y pirazinamida (amida del ácido pirocinoico, PZA), durante los dos primeros meses; e INH y RIF hasta completar los 6 meses de tratamiento (World Health Organization, 2010). En el caso de pacientes con tinciones de esputo positivas, tuberculosis pulmonar diseminada, antecedentes de contacto con un paciente con

tuberculosis resistente conocida y/o pacientes coinfectados con VIH, también se administra un cuarto fármaco llamado etambutol (EMB) o en algunos casos la estreptomycin (STR). Los fármacos mencionados se conocen como fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis. Existen otros fármacos de segunda línea o de reciente desarrollo que constituyen una alternativa para el tratamiento en determinadas situaciones, como son el ácido paraaminosalicílico (PAS), cicloserina, etionamida, rifamicinas, fluoroquinolonas (QNL) u oxazolidinonas, entre otros (Drobniewski *et al.*, 2007).

**Tabla 5.** Actividad, mecanismos de acción y de resistencia de los antimicrobianos antituberculosos de primera línea (adaptado de Telenti, 1998)

Antibiótico	Actividad	Mecanismo de acción
INH	Bactericida: bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos
RIF	Bactericida: bacilos metabólicamente activos, en estado de latencia y con crecimiento intermitente	Inhibición de la transcriptasa
PZA	Bactericida: bacilos en estado de latencia en el interior de macrófagos	Sistemas de bombeo, inhibición de la síntesis de ácidos micólicos /baja pH intracelular
EMB	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomano (pared celular)
STR	Bactericida: bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis proteica
QNL	Bactericida: bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de ADN-girasa

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; PZA: pirazinamida; EMB: etambutol; STR: estreptomycin; QNL: quinolona

La actividad y el mecanismo de acción de los antibióticos de primera línea son muy diversos aunque en su mayoría actúan inhibiendo la síntesis de los compuestos de la pared celular, como los ácidos micólicos (Tabla 5). La selección de estos fármacos (INH, RIF y PZA) no es casual ya que su combinación está dirigida a los distintos tipos de poblaciones: bacilos metabólicamente activos, en estado de latencia o con crecimiento intermitente. De esta forma los antibióticos INH, EMB y STR actúan sobre los bacilos metabólicamente activos, la RIF además sobre bacilos en estado de latencia y con crecimiento intermitente, y la PZA sobre los bacilos en estado de latencia con crecimiento intermitente (Tabla 5). La actuación de los fármacos INH, PZA y EMB radica en la inhibición de la síntesis de algunos compuestos de la pared celular, principalmente los ácidos micólicos. Otros antibióticos como RIF, STR o QNL actúan inhibiendo la síntesis de proteínas que interfieren en la replicación o la transcripción.





## 5. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

El análisis de la sensibilidad antibiótica de las cepas causantes de tuberculosis es esencial porque: 1) influye en el desarrollo de las bases para el tratamiento en humanos; 2) aporta información en el sistema de vigilancia de la enfermedad; y 3) sirve de guía para los casos clínicos con resistencias probadas a los antibióticos de primera línea.

Antes de los años 50, no existían fármacos para el tratamiento de la tuberculosis. En la actualidad se han descrito cepas resistentes a un único antibiótico en todo el mundo (World Health Organization, 2009). La aparición de resistencias en *M. tuberculosis* puede ocurrir de forma natural en ausencia de presión antibiótica, oscilando la presencia de mutantes en una población entre  $10^{-8}$  y  $10^{-3}$ . Sin embargo, la aparición de cepas resistentes hoy en día está asociada a un tratamiento inconstante o parcial, cuando los pacientes no toman sus medicinas de forma regular en el periodo requerido debido a que empiezan a sentirse mejor, o porque se prescribe un régimen de tratamiento erróneo debido al desconocimiento de la sensibilidad antibiótica.

Los métodos más empleados para realizar los estudios de sensibilidad antibiótica en las especies de MTBC se pueden subdividir en métodos convencionales, automatizados o basados en la detección de mutaciones.

### 5.1. Métodos convencionales

La estandarización de los métodos para establecer la sensibilidad antibiótica de *M. tuberculosis* fue definida en un simposio organizado por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional frente a la Tuberculosis en la década de 60 (Drobniewski *et al.*, 2007). Los tres métodos aceptados internacionalmente fueron 1) el método de las concentraciones absolutas; 2) el método del ratio-resistencia; y 3) el método de las proporciones. Estas técnicas diferían tanto en el medio de cultivo empleado como en la cantidad de inóculo, la concentración mínima del antibiótico testado, y el criterio usado para establecer la resistencia, lo que ocasionaba la aparición de errores y discrepancias entre los resultados de dichos métodos. De todos ellos, el método de las proporciones (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969) se considera actualmente la técnica de referencia ya que se reduce la posibilidad de cometer sesgos para determinar si una cepa es sensible o resistente. Este método consiste en realizar el test de sensibilidad con dos diluciones bacilares distintas: por una parte, debe contener el número de bacilos suficientes para permitir un análisis exacto de la cepa y, por otra parte, proporcionar colonias en número contable, tanto sobre el medio testigo como sobre los medios con antibiótico. Las colonias del medio sin antibiótico indican el número total de bacilos sembrados; y las colonias sobre el medio con antibiótico indican los únicos bacilos resistentes. La relación de los segundos con los primeros indica la proporción de bacilos resistentes que existe en esa población. Por debajo de una determinada proporción, denominada crítica, la cepa se considera sensible, y por encima, resistente.

Debido al riesgo de transmisión de la tuberculosis de los animales al hombre es obligatorio el sacrificio de los animales infectados. En un laboratorio veterinario se

realizan de forma rutinaria el aislamiento y la tipificación de las micobacterias procedentes de estos animales infectados, principalmente *M. bovis*. La prohibición de tratar animales infectados hace que la evaluación de la sensibilidad antibiótica de los aislados de procedencia animal sea una práctica inusual (Sechi *et al.*, 2001; Cavirani *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2006). Los estudios de sensibilidad realizados en Brasil y Estados Unidos sobre aislados de *M. bovis* de procedencia animal afirman la sensibilidad de los aislados a la isoniazida y rifampicina (Hughes *et al.*, 2003), además a la estreptamicina y el etambutol (Parreiras *et al.*, 2004), y las quinolonas (Daly *et al.*, 2006). Por otra parte, estos resultados se contradicen con los altos porcentajes de resistencia a la isoniazida y rifampicina encontrados en Italia (Sechi *et al.*, 2001; Cavirani *et al.*, 2003), que oscilan entre el 21 y el 68%.

La información relativa a la sensibilidad de las cepas de *M. bovis* de procedencia humana es algo superior, ya que la evaluación de la sensibilidad se realiza de forma rutinaria para conseguir un tratamiento eficaz (Bouvet *et al.*, 1993; Guerrero *et al.*, 1997; Nitta *et al.*, 2002; Lumb *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2003).

## 5.2. Métodos automatizados

En la actualidad, el uso de los métodos automatizados está en auge para la detección y recuperación de micobacterias de muestras clínicas (Hanna *et al.*, 1999; Kanchana *et al.*, 2000), debido principalmente a la reducción en el tiempo de aislamiento, así como para determinar la resistencia a la isoniazina y la rifampicina, entre otros antibióticos de primera línea (Bergmann y Woods, 1998; Ruiz *et al.*, 2000; LaBombardi, 2002; Scarparo *et al.*, 2004; Krüüner *et al.*, 2006). El uso de estos métodos, tales como BACTEC MGIT 960 (Bemer *et al.*, 2002) o Culture System II (Bergmann y Woods, 1998; Ruiz *et al.*, 2000), ambos basados en un sistema de medio líquido, tienen la ventaja de obtener el resultado de sensibilidad o resistencia al antibiótico testado en un tiempo menor que con los métodos convencionales. Sin embargo, el coste de estos métodos es mucho mayor en comparación con los métodos basados en el cultivo sólido.

El funcionamiento de estos sistemas es muy sencillo. En el caso de sistema automático Culture System II (VersaTREK Myco, Cleveland, Ohio, EE.UU.), más comúnmente denominado ESP Culture System, Difco, Detroit, EE.UU.), se prepara una suspensión de la cepa con una turbidez 1 McFarland se realiza una dilución 1:10. Se inocula 0,5 ml de esta dilución en los medios de cultivo, uno libre de antibiótico (medio control) y el resto con los antibióticos a testar. Además se les añade un suplemento (OADC) para el crecimiento. El equipo al que se conectan los medios chequea periódicamente su crecimiento. Cuando el medio control se da como positivo, durante los tres días siguientes se realizan lecturas de los medios con antibiótico. Los resultados se interpretan de acuerdo a la siguiente fórmula: la cepa es resistente cuando el tiempo de detección en el medio con antibiótico es igual o está comprendido en los tres días anteriores o posteriores al crecimiento en el medio control; la cepa es sensible cuando no existe crecimiento en los medios con antibiótico o cuando crece pasados tres días tras el crecimiento en el medio control.

### 5.3. Métodos basados en mutaciones

Muchos estudios genéticos han demostrado que los miembros de MTBC, además de presentar una resistencia natural a ciertos antimicrobianos por su pared celular, pueden adquirir mutaciones puntuales espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco o enzimas implicadas en la activación del mismo (Ramaswamy y Musser, 1998; Somoskovi *et al.*, 2001; Rossetti *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2003). Estas mutaciones son responsables de la resistencia a fármacos antituberculosos. La tasa con la que tiene lugar estas mutaciones difiere para cada uno de los antimicrobianos, siendo la más elevada la del EMB y las más bajas la de RIF y QNL (Tabla 6). Por otra parte, no se conoce una única alteración genética que dé lugar al fenotipo multiresistente, siendo aquel que presenta resistencias como mínimo a INH y RIF. Los principales polimorfismos asociados a la resistencia frente a los fármacos antituberculosos aparecen resumidos en la tabla 6.

**Tabla 6.** Genes implicados en la aparición de la resistencia antibiótica y frecuencia de aparición de mutantes

Antibiótico	Mecanismo de acción	Base genética de mutantes resistentes	Frecuencia
INH	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	<i>katG</i> (39,5-92%) <i>inhA</i> (25%) Otros	$10^{-5}$ - $10^{-6}$
RIF	Inhibición de la transcriptasa	<i>rpoB</i> (96-98%)	$10^{-8}$
PZA	Sistemas de bombeo, inhibición de la síntesis de ácidos micólicos /baja pH intracelular	<i>pncA</i> (61-97%)	$10^{-3}$ - $10^{-4}$
EMB	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomanano (pared celular)	<i>embCAB</i> (47-69%)	$10^{-6}$
STR	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rpsL</i> (52-59%) <i>rrs</i> (8-21%)	$10^{-6}$
QNL	Inhibición de la síntesis de ADN-girasa	<i>gyrA</i> (42-85%) <i>gyrB</i>	$10^{-3}$

Adaptado de Telenti *et al.*, 1998

La INH es un inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. Hasta el momento, la resistencia a la INH parece estar asociada a una gran variedad de mutaciones que afectan a varios genes, como son aquellos que codifican la catalasa peroxidasa (*katG*), la reductasa de la proteína transportadora de ácidos grasos acilenólicos (*inhA*), la proteína alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC*), la enzima cetoacil ACP (*acyl carrier protein*) sintasa (*kasA*), la proteína NADH deshidrogenasa (*ndh*) o la región intergénica *oxyR-ahpC* (Sreevatsan *et al.*, 1997b; Ramaswamy *et al.*, 2003; Vilchèze y Jacobs, 2007). El gen más comúnmente estudiado y en el que se encuentran más polimorfismos asociados a la resistencia antibiótica es *katG*.

Sin embargo, los estudios realizados sobre aislados de *M. tuberculosis* resistentes a la INH señalan que el porcentaje de cepas INH resistentes con mutaciones en el gen *katG* varía entre el 39,5-92% (Rossetti *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2003; Silva *et*

*al.*, 2003; Abdelaal *et al.*, 2009). Dentro de este gen, la variación genética en el aminoácido 315 es la más frecuente (AGC→ATC; Ser315Thr) y se encuentra aproximadamente en un 40% de las cepas resistentes. Por otro lado hay que destacar que la presencia de mutaciones en este gen está asociada con un tipo de resistencia de alto nivel (concentración mínima inhibitoria, CMI>1mg/ml). Las mutaciones descritas en el gen *inhA* se encuentran tanto en la región reguladora del gen como en la codificante (Ramaswamy y Musser, 1998) y originan una sobreexpresión de la enzima que compensa la acción inhibitoria del fármaco. Aproximadamente en el 25% de las cepas resistentes a INH se producen mutaciones en la región *inhA* y suelen asociarse a una resistencia de bajo nivel (CMI>0,2 mg/ml) (Ramaswamy *et al.*, 2003). Entre el 10-20% de las cepas resistentes a la INH no presentan alteraciones en el gen *kat* ni *inhA*; de ahí que se hayan estudiado otros genes que pudieran estar implicados en esta resistencia, tales como *ahpC*, *kasA* o *ndh*, entre otros.

La RIF es un potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y, por tanto, de la transcripción genética. Todos los estudios realizados sobre la resistencia a la RIF muestran una asociación directa entre la resistencia a la RIF y mutaciones en una región bien definida de 81 pb de la región central del gen, que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Telenti *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Musser, 1995). Más del 95% de las cepas resistentes a la RIF poseen mutaciones en esta región. Según un estudio realizado por Musser en 1995 se han descrito más de 35 variantes alélicas (Musser, 1995). Sin embargo, las más comunes son las que afectan a los codones 526 y 531 (65-85%), que dan lugar a una resistencia de alto nivel (CMI>32μg/ml). La resistencia a la RIF se asocia a la resistencia a la INH, por lo que su detección constituye un marcador de multiresistencia.

El antituberculoso PZA, derivado sintético de la nicotinamida, requiere de la enzima pirazinamidasas (*pncA*) para activarse (Scorpio y Zhang, 1996; Zhang y Mitchison, 2003). Se ha observado que entre el 61-97% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA poseen mutaciones dispersas en el gen estructural (regiones 3–17, 61–85 y 132–142) o en el promotor de la pirazinamidasas (Scorpio *et al.*, 1997; Lemaitre *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009). Es muy importante recordar que la especie *M. bovis* (incluyendo la variedad BCG) es resistente a la PZA de forma natural (Konno *et al.*, 1967; Scorpio y Zhang, 1996), y presenta una mutación en el nucleótido 169 (C→G), causando una sustitución en el codón 57 de histidina a ácido aspártico (His57Asp). Por lo tanto *M. bovis* debe ser considerado un caso especial de resistencia a la PZA, y de ahí la importancia de una correcta identificación del agente causal de la tuberculosis en los laboratorios de diagnóstico para realizar un tratamiento antibiótico adecuado.

El EMB es un antibiótico que actúa inhibiendo de forma específica la síntesis de dos componentes de la pared celular: el arabinogalactano y el lipoarabinomano. Así, la resistencia al EMB se asocia con cambios en una región genómica definida, el operón *embCAB* (Telenti *et al.*, 1997), que codifica arabinosiltransferasa. Entre el 47% y el 69% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes presentan mutaciones en la región *embB* (Telenti *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1997c; Parsons *et al.*, 2005). Según un estudio realizado por Sreevatsan y colaboradores sobre 99 cepas de *M. tuberculosis* (69 EMB resistentes y 30 EMB sensibles), el 69% de las cepas presentaron un cambio aminoacídico en *embB*, estando localizadas en el codón 306 el 89% de las

mutaciones (Sreevatsan *et al.*, 1997b). En un estudio realizado por Parson y colaboradores sobre un total de 128 aislados resistentes a distintas concentraciones de EMB, los polimorfismos más frecuentes se encuentran en este codón en un 77% de los aislados, con un cambio de metionina a valina (Met306Val) (Parsons *et al.*, 2005).

La STR es un aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm, tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica. En las micobacterias, el mecanismo de resistencia conocido es por alteración (mutaciones cromosómicas) de la diana sobre la que actúan: el ARN ribosómico subunidad 16S. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican la proteína ribosomal 12S (*rpsL*) y el ARNr 16S (*rrs*). Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en el 52-59% de las cepas resistentes (Abbadi *et al.*, 2009) y produce una resistencia de alto nivel (CMI>500 µg/ml) (Honore y Cole, 1994; Meier *et al.*, 1996), mientras que las que afectan al gen *rrs* se observan en el 8-21% de las cepas y producen resistencia de nivel intermedio (50<CMI<500 µg/ml) (Sreevatsan *et al.*, 1996). Las mutaciones más frecuentes en el gen *rpsL* están en los codones 43 y 88, originándose un cambio de lisina a arginina (Lys43Arg). En relación al gen *rrs* las mutaciones que se han descrito se encuentran entre las bases 426 y 526, con frecuencias variadas (Meier *et al.*, 1996; Spies *et al.*, 2008). Actualmente también se está estudiando la posible implicación de mutaciones encontradas en el gen que codifica una metiltransferasa específica para el ARNr 16S (*gidB*) y las bombas de eflujo, ya que algunos estudios demuestran que confiere resistencia de nivel bajo a la STR (Meier *et al.*, 1996; Spies *et al.*, 2008).

Las QNL tienen su actividad a nivel de las topoisomerasas de tipo II y, fundamentalmente, sobre la ADN girasa compuesta de dos subunidades A (*gyrA*) y de dos subunidades B (*gyrB*) (Wang, 1985). El desarrollo de la resistencia a las quinolonas es un proceso complejo que generalmente asocia mutaciones que afectan a la ADN girasa, topoisomerasa IV y/o proteínas de membrana que regulan la permeabilidad y el eflujo del fármaco. Varios autores han descrito la presencia de mutaciones en la subunidad A que confieren un nivel de resistencia alto, estando principalmente localizadas en los codones 88 (glicina → cisteína), 90 (alanina → valina), 91 (serina → prolina) y 94 (ácido aspártico → asparagina) (Takiff *et al.*, 1994; Dauendorffer *et al.*, 2003). Además, las mutaciones encontradas en las cepas resistentes a las quinolonas están asociadas en su mayoría al gen *gyrA* y oscilan entre el 42% y el 85%. Las mutaciones encontradas en el gen *gyrB* no parecen estar asociadas de forma independiente a la resistencia. Sin embargo, altos niveles de resistencia (CMI =20 g/ml) se han observado en aislados con una mutación en el gen *gyrA* y otra en *gyrB*, o una doble mutación en el gen *gyrA* (Kocagoz *et al.*, 1996).

Debido a la existencia de estas variaciones genéticas y a la aparición cada vez más frecuente de cepas multirresistentes se han desarrollado en la última década kits comerciales que detectan algunas de estas mutaciones previamente comentadas. Los principales sistemas están basados en la detección de aislados resistentes a la rifampicina, ya que un porcentaje superior al 95% presenta mutaciones en un único gen y en una zona restringida. El uso de estos sistemas de detección, tales como Rifoligotyping "RIFO assay" (Morcillo *et al.*, 2002) e INNO-LiPA Rif. TB® (LiPA) (Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica) permiten una rápida identificación de los aislados resistentes a la rifampicina (Morgan *et al.*, 2005). Sin embargo, hay que tener en

cuenta que existe un porcentaje de aislados resistentes con ausencia de mutaciones en este gen.

#### 5.4. Interferencia entre el piruvato y la isoniazida

El uso de técnicas bioquímicas para la identificación de los miembros de MTBC ha sido ampliamente utilizado hasta la aparición de técnicas moleculares que han facilitado su identificación. En lo referente a los requerimientos nutritivos de *M. bovis*, está bien documentado que el glicerol no sirve como fuente de energía. Por este motivo, los medios que contengan glicerol deben ser suplementados con piruvato sódico u otra fuente de carbono (Grange *et al.*, 1996; Drobniewski *et al.*, 2003; Keating *et al.*, 2005).

La estandarización de los métodos convencionales para establecer la sensibilidad de una cepa de MTBC se basó en los estudios realizados tomando como modelo cientos de aislados de la especie *M. tuberculosis* y, por ende, se extendió para el resto de miembros del complejo. Sin embargo, algunos estudios realizados entre los años 50 y 70 mostraron el efecto inhibitorio de varios compuestos sobre algunos de los antibióticos usados frente a la tuberculosis. En 1953 y 1955, Pope realizó varios estudios sobre el antagonismo existente entre la isoniazida y ciertos metabolitos (Pope, 1953), observando que la isoniazida inhibía la oxidación de compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, como la glucosa, el glicerol, el piruvato, el lactato o el acetato. Esta inhibición de la INH era neutralizada completamente al añadir piridoxal u otros compuestos como el piruvato sódico (Pope, 1955). Otros autores reafirmaron la acción inhibitoria del piruvato sobre la INH (Garattini y Leonardi, 1954; Boisvert, 1970) y concluyeron que el piruvato podría falsear la prueba de sensibilidad. Al realizar un estudio sobre la aptitud de los medios Coletso y Löwenstein-Jensen para estudiar la sensibilidad a la cicloserina, antibiótico usado también para el tratamiento de la tuberculosis, Tison y colaboradores observaron también un efecto inhibitorio del piruvato sobre la cicloserina (Tison *et al.*, 1963).

## 6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

La identificación y caracterización de los aislados de micobacterias anterior a la década de los 90 se realizó principalmente mediante técnicas fenotípicas, y fue en los años 90 cuando comenzó la aplicación de técnicas basadas en el estudio de ADN de las bacterias gracias a los avances en el campo de la biología molecular.

La necesidad de técnicas moleculares que permitan la diferenciación molecular de los aislados es evidente. La aplicación de estas técnicas ha sido muy importante ya que ayudan a determinar el origen de los brotes, a comprender el vínculo entre los distintos brotes, a mostrar las relaciones entre los casos de tuberculosis en animales domésticos y salvajes, o incluso a identificar la fuente de infección en humanos.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, las especies incluidas en MTBC se caracterizan por presentar un alto grado de homología genética, mostrando un porcentaje de homología del 99,95% a nivel nucleotídico y una secuencia idéntica para el gen que codifica el ARN ribosómico 16S (Brosch *et al.*, 2002). La conservación de secuencias entre todos los miembros de MTBC tiene una consecuencia práctica muy importante: las técnicas desarrolladas para la caracterización molecular de una especie se pueden adaptar a las otras. A pesar de esta homogeneidad genética entre los miembros de MTBC existen varias regiones del ADN muy polimórficas, que varían tanto en el número y/o posición del elemento genético estudiado o en la estructura primaria del mismo. Estas regiones polimórficas se corresponden en muchas ocasiones con genes que codifican proteínas cuya variabilidad les proporciona una ventaja selectiva sobre otras bacterias, como por ejemplo la resistencia a ciertos antibióticos (Telenti *et al.*, 1993) o los antígenos implicados en la evasión de la respuesta inmune (Baena y Porcelli, 2009). Otros polimorfismos se encuentran en regiones intergénicas que pueden inducir variabilidad en los genes adyacentes, como pueden ser las secuencias de inserción (*insertion sequence*, IS) (Otal *et al.*, 2008) o la repetición de una misma secuencia.

El estudio de cada una de estas regiones polimórficas ha dado lugar a la descripción y puesta a punto de una o varias técnicas de caracterización molecular, algunas de las cuales se han usado para tipificar los aislados incluidos en esta tesis doctoral. A continuación se describen las principales dianas utilizadas en el estudio de MTBC, así como una breve descripción de las técnicas de caracterización molecular diseñadas para la detección de cada una de estas regiones polimórficas, haciendo una mención especial a las técnicas más usadas para la caracterización molecular de *M. bovis*/*M. caprae*.

### 6.1. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (*insertion sequence*, IS) son transposones, fragmentos de ADN que codifican funciones que les permiten moverse de un sitio de una molécula de ADN a otro. Su longitud puede oscilar entre 780 nucleótidos y 2,5 kbases. Las IS sólo codifican proteínas relacionadas con su actividad de transposición, como son las transposasas. En la actualidad en el género *Mycobacterium* se han descrito más de 46 IS en 10 especies bacterianas (McAdam *et al.*, 2000), número que sigue aumentando gracias a la información obtenida a partir de la secuenciación de los



genomas de micobacterias. En MTBC se ha descrito la presencia de 25 secuencias de inserción (Cole *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1999), habiéndose utilizado algunas de ellas para estudios de caracterización molecular. El empleo de estos elementos ha sido de gran utilidad, ya que dependiendo del número de copias en un genoma y de su movilidad pueden usarse para determinar el grado de relación entre los aislados y, por tanto, el vínculo epidemiológico. Sin embargo, los datos que se pueden extraer de la presencia/ausencia y número de IS en una bacteria debe ser analizada cuidadosamente, ya que se tratan de elementos móviles por naturaleza (Behr y Mostowy, 2007). Basándonos en el genoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv la mayoría de estos elementos móviles están insertados en regiones intergénicas o regiones no codificantes.

Las dos secuencias de inserción más usadas para la caracterización molecular de MTBC son IS6110 e IS1081.

#### 6.1.1. IS6110

La secuencia de inserción IS6110 está compuesta por 1.361 pb y contiene 28 pb de repeticiones imperfectas invertidas en sus extremos, las cuales difieren en tres nucleótidos y poseen repeticiones directas de tres pb que probablemente resultan de la repetición de la secuencia diana (Thierry *et al.*, 1990a). Aunque la nomenclatura de esta IS fue dada por Thierry y colaboradores en 1990, la denominación definitiva de esta IS se establece a partir de 1995, ya que previamente en los artículos se refieren a ella como IS986, en *M. tuberculosis* (Hermans *et al.*, 1990; McAdam *et al.*, 1990), e IS987, en *M. bovis* BCG (Hermans *et al.*, 1991; Poulet y Cole, 1995). Esta secuencia posee semejanzas con las secuencias de inserción de la familia IS3 de las enterobacterias (Thierry *et al.*, 1990a). Además, se considera una secuencia específica de los miembros incluidos en MTBC ya que en todos los estudios realizados en los que se comprobó la especificidad de esta secuencia resultó no estar presente en otras especies de micobacterias distintas a MTBC (Thierry *et al.*, 1990a; Thierry *et al.*, 1990b; Cave *et al.*, 1991). La diferencia en la localización y el número de copias de esta IS es una fuente de polimorfismos entre los aislados. En varios estudios se ha demostrado la preferencia de integración de la secuencia IS6110 en varios loci, estando dos de ellos incluidos en la región DR, y otros dos en las regiones flanqueantes 3' y 5' de esta región (Hermans *et al.*, 1991; Fang y Forbes, 1997).

De todas las secuencias de inserción descritas en MTBC, IS6110 es el marcador genético más importante y ampliamente usado para diferenciar aislados clínicos de *M. tuberculosis* y, por consiguiente, para realizar estudios epidemiológicos fiables. A diferencia de la variabilidad obtenida para los aislados de *M. tuberculosis*, todos los estudios realizados en aislados de *M. bovis* reflejan el escaso número de copias de esta secuencia de inserción, presentando en la mayoría de los casos un número de copias inferior a seis y en un alto porcentaje una única copia (Collins *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1993; Aranaz *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999). Las cepas de *M. bovis* BCG también se caracterizan por presentar una única copia de esta IS en una posición única (Hermans *et al.*, 1991); sin embargo, algunos autores han encontrado la presencia de dos copias de esta secuencia de inserción en las cepas vacunales de

BCG (van Soolingen *et al.*, 1992). Este hecho hace que IS6110 no se use como diana para la caracterización molecular de los aislados de *M. bovis*.

#### 6.1.2. IS1081

La secuencia de inserción IS1081 está compuesta por 1.324 pb que incluye 15 pb repetidas e invertidas en sus extremos, además de poseer un marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) (Collins y Stephens, 1991; Poulet y Cole, 1995). IS1081 no está relacionado estrechamente con otros elementos de repetición descritos en el orden *Actinomycetales* (ej. IS6110) pero su transposasa presenta cierta semejanza con la secuencia IS256 de *Staphylococcus aureus* (Collins y Stephens, 1991). Al igual que IS6110, la secuencia de inserción IS1081 ha sido considerada exclusiva de los miembros de MTBC. Sin embargo en un estudio realizado en 1993 se halló una cepa de *M. xenopi* con esta secuencia de inserción, siendo ésta una especie ocasionalmente patógena en humanos (Collins *et al.*, 1993).

Los estudios realizados por van Soolingen y colaboradores demostraron que el número de copias de IS1081 oscila entre cinco y seis en el genoma de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. microti*, por lo parece ser un marcador molecular demasiado estable para el tipado de cepas y, por lo tanto, existe poca heterogeneidad en cuanto a los sitios de inserción de IS1081 en el genoma de *M. bovis* (van Soolingen *et al.*, 1992). Sin embargo, la inclusión de IS1081 como marcador molecular permitió en la década de los 90 la discriminación de *M. bovis* BCG respecto al resto de miembros incluidos en MTBC, ya que estas cepas presentan un fragmento de 8 kb inexistente en otras especies incluidas en MTBC (van Soolingen *et al.*, 1992).

### 6.2. Secuencias de repetición cortas (SSR)

#### 6.2.1. Secuencias con un alto contenido en GC

Las micobacterias presentan un alto contenido de bases G+C que constituyen aproximadamente el 66% del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2003). A lo largo del genoma bacteriano existen secuencias cortas de menos de 10 pb de longitud, repetidas en tándem y distribuidas en múltiples grupos, cuya composición de bases GC excede el 80%. Estas secuencias polimórficas con un alto contenido en G+C se denominan *polymorphic GC-rich sequence* (PGRS). Estos PGRS se encuentran en genes estructurales como tripletes repetidos que frecuentemente contienen el motivo CGC. Estos dominios genéticos están asociados a la familia de genes llamada PE, cuyos genes codifican las proteínas PE-PGRS, que se caracterizan por la abundancia de los motivos prolina-ácido glutámico en la región amino-terminal (Poulet y Cole, 1995). Se han encontrado más de 65 copias de estos genes altamente homogéneos que están presentes sólo en las micobacterias. Algunos autores han sugerido que las repeticiones que se encuentran en la región carboxilo terminal, donde se encuentran la zona con alto porcentaje GC, es rica en los aminoácidos glicina-glicina-alanina o glicina-glicina-asparagina, y actúan como inhibidores del procesamiento de antígeno y, por consiguiente de la presentación de los mismos (Brennan y Delogu, 2002). Por otra parte varios estudios han demostrado su

posible implicación en generar una diversidad inmunológica mediante delecciones e inserciones que generalmente ocurren en las zonas ricas en glicina repetidas (Ross *et al.*, 1992a; Cole *et al.*, 1998). Esta idea está apoyada por estudios que muestran que las proteínas PE-PGRS se encuentran en la superficie de las micobacterias (Brennan *et al.*, 2001; Banu *et al.*, 2002).

A diferencia de otros marcadores moleculares, los genes PE-PGRS están dispersos en el genoma de MTBC así como en otras especies de micobacterias, entre las que se incluyen *M. gastri*, *M. goodii*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. malmoense* y *M. phlei* (Ross *et al.*, 1992b). Debido a que este elemento no está restringido a MTBC, es necesaria la correcta identificación de los aislados antes de usar PGRS como marcador molecular.

#### 6.2.2. Secuencias de repetición del triplete GTG

Estas secuencias cortas repetidas en tándem se consideran una alternativa cuando el número de copias de las secuencias de inserción es bajo en la especie estudiada. En este caso se diseñan sondas formadas esencialmente por simples repeticiones en tándem de la secuencia repetida, siendo en este caso el triplete GTG, que reconoce *loci* polimórficos. A pesar de que estas secuencias se han usado para la realización de estudios epidemiológicos de aislados de *M. tuberculosis* con resultado similares a los obtenidos con la secuencia de inserción IS6110 (Wiid *et al.*, 1994), el uso de los triplete GTG no ha prosperado.

#### 6.2.3. Secuencias de repetición con polimorfismos mayoritarios

Algunas de las secuencias de ADN repetido existentes en las especies de MTBC pertenecen a una familia que se caracteriza por presentar repeticiones en tándem de una secuencia de nucleótidos formado por 10 pb, separados por un espaciador de 5 pb no repetido. A estas secuencias se les denomina secuencias de repetición con polimorfismos mayoritarios (*major polymorphic tandem repeat*, MPTR) (Hermans *et al.*, 1992). Según estos autores el genoma de *M. tuberculosis* presenta alrededor de 80 regiones con MPTRs. Estas secuencias de 10 pb se caracterizan por presentar al menos 6 pb en común, habiendo sido establecida una secuencia consenso (5' GCCGGTGTG 3'). Esta secuencia de nucleótidos presenta una alta homología con una secuencia localizada en un ORF "corriente abajo" del gen (*downstream*) que codifica la proteína de estrés térmico hsp65 (*heat shock protein*) de *M. tuberculosis*. Esta región del ADN contiene tres agrupaciones con repeticiones de 10 pb, cada una de las cuales comparte al menos cinco bases con la secuencia consenso establecida. Además esta secuencia comparte cierta homología con la señal de recombinación chi y las secuencias REP, estando ambas presentes en copias múltiples en el cromosoma de *Escherichia coli*.

Al igual que PGRS está incluido en la familia de proteínas PE, MPTR se encuadra en la familia de proteínas PPE, que se caracterizan por la abundancia de los motivos prolina-prolina-ácido glutámico en la región amino-terminal. MPTR se encuentra en el extremo carboxilo terminal y se caracteriza por la presencia de múltiples copias

repetidas en tándem de los motivos Asparagina-X-Glicina-X-Glicina-Asparagina-X-Glicina.

Estas secuencias de ADN no son exclusivas de MTBC, sino que también se comparten con otras especies de micobacterias tales como *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. asiaticum*, *M. gastri* y *M. szulgai* (Hermans *et al.*, 1992). Sin embargo hay que destacar que todas las especies que presentan homología en MPTR pertenecen al grupo de las micobacterias de crecimiento lento.

### 6.3. Otras secuencias de repetición

#### 6.3.1. *Locus* DR

El *locus* de repetición directa (*direct repeat*, DR) es el único *locus* en el genoma de los miembros de MTBC que muestra un considerable grado de polimorfismos. Esta región está formada por dos tipos de secuencias: unas secuencias denominadas DR (*direct repeat*) que son todas ellas idénticas y de un tamaño de 36 pb, separadas por otras secuencias llamadas espaciadores con un tamaño entre 34 y 41 pb (Hermans *et al.*, 1991; van Soolingen *et al.*, 1993; Groenen *et al.*, 1993). La diferencia entre dos aislados reside en la presencia/ausencia de estos espaciadores. A la secuencia formada por un DR y su espaciador adyacente se le denomina DVR (*direct variant repeat*). Estos polimorfismos se han empleado para distinguir entre las cepas de los miembros de MTBC (Aranaz *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999), así como los taxones dentro del grupo de MTBC (van Soolingen *et al.*, 1997; van Soolingen *et al.*, 1998; Aranaz *et al.*, 1999).

En la actualidad, la función del *locus* DR se desconoce. Sin embargo, la presencia de esta inusual región en MTBC y la extremada conservación de los DRs y los espaciadores entre los aislados clínicos sugiere una función biológica de la región DR para el hospedador y, debido a una ventaja selectiva, esta región se ha mantenido en la población. A pesar de que no existe una fuerte selección por mantener intactas las secuencias DR, no se ha descrito ninguna cepa de MTBC con todo el *locus* DR ausente. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Groenen y colaboradores se sugiere la implicación de esta región en la unión de proteínas (Groenen *et al.*, 1993). Aunque la homología entre las secuencias DR de MTBC y el ADN de otros géneros bacterianos no se ha descrito, existen otros *loci* con motivos parecidos compuestos por una secuencia corta repetida y otra no repetida (van Embden *et al.*, 2000). Por ejemplo, en el género *Haloferax* existe un *locus* que podría estar implicado en la replicación (Mojica *et al.*, 1995).

Varios estudios han demostrado la preferencia de integración de la secuencia de inserción IS6110 en este *locus* DR (Hermans *et al.*, 1991; Philipp *et al.*, 1996), aunque en un principio se creyó que la integración de IS6110 en el genoma era aleatoria. El *locus* DR presenta una alta frecuencia de incluir esta IS y ha sido propuesto como un punto selectivo para la integración de este elemento, aunque la mayoría de las copias están insertadas en un único punto. En 1991, Hermans y colaboradores mostraron que aproximadamente el 85% de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas llevaban una o dos copias de IS6110 en la región DR del cromosoma. Parece ser que esta IS no tiene la capacidad de moverse desde esta región tan fácilmente como lo

hace desde otras localizaciones genómicas (Hermans *et al.*, 1991). En las cepas de *M. bovis* que únicamente tienen una copia de este elemento móvil, IS6110 está insertada en el DR localizado entre los espaciadores 24 y 25 (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Es importante destacar que los mecanismos de microevolución del locus DR parecen estar unidos a la presencia de IS6110: en el caso de las cepas con un reducido número de copias, el mecanismo de pérdida de DVRs parece ser la recombinación homóloga entre las secuencias DR adyacentes o lejanas (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998); y en el caso de que las cepas sean portadoras de un alto número de copias de IS6110, se podría producir recombinación homóloga entre IS cercanos y, en consecuencia, conllevaría una pérdida de una gran parte del locus DR (Warren *et al.*, 2002).

### 6.3.2. Número variable de repeticiones en tándem

Las secuencias repetidas en tándem se describieron por primera vez en los genomas eucariotas. Se les llama microsatélites a los loci con secuencias cortas repetidas (*short sequence repeats*, SSRs) de 1-4 pb; mientras que a los loci con 10-100 pb se les conoce como minisatélites. Muchas de estas secuencias presentan hipervariabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones y/o con la variabilidad entre las secuencias (*variable number tandem repeats*, VNTRs). En las últimas décadas, se han descrito en las micobacterias regiones similares a los minisatélites encontrados en humanos (Supply *et al.*, 1997; Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998). La mayoría de los VNTRs encontrados en los genomas secuenciados disponibles, por ejemplo *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se corresponden con las llamadas unidades de repetición intercaladas en el genoma de las micobacterias (*mycobacterial interspersed repetitive units*, MIRUs), que son minisatélites compuestos por secuencias de un tamaño entre 40-100 pb, distribuidos en 41 localizaciones del cromosoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply *et al.*, 2000).

La localización intergénica de los marcadores MIRU-VNTR en las especies incluidas en el género *Mycobacterium* (por ejemplo *M. tuberculosis* y *M. leprae*), hace que la mayoría los minisatélites MIRU-VNTRs que contienen un ORF solape con los codones de terminación e iniciación de los genes adyacentes o flanqueantes (Supply *et al.*, 1997). Además algunos MIRU-VNTRs se sitúan dentro de esas regiones codificantes, por lo tanto, el número de copias presentes para cada marcador podría influir en la expresión de ese gen.

### 6.4. Genes del metabolismo basal celular

Los genes que codifican proteínas suelen ser estables ya que deben conservar su función metabólica, siendo tales genes clasificados como los genes implicados en el metabolismo basal celular (*housekeeping genes*). La aparición de una sustitución de una base puede dar lugar a un cambio aminoacídico que permanece en la población, y su permanencia en la misma se ve favorecida. Estos genes evolucionan lentamente y pueden indicar relaciones genéticas entre aislados bacterianos de una forma más fiable que los genes sometidos a una presión selectiva positiva, como son aquellos genes que confieren resistencia antibiótica o genes que codifican

antígenos. La selección de los genes que ofrecen un mayor grado de polimorfismos dependerá del patógeno a caracterizar pero el requisito que deben cumplir estos genes es 1) la conservación de su función metabólica, a pesar de que se produzcan mutaciones no sinónimas (con cambio aminoacídico) y, 2) que los cambios se produzcan de una forma relativamente lenta.

**Tabla 7.** Genes o enzimas del metabolismo basal seleccionados para realizar estudios epidemiológicos en aislados del género *Mycobacterium*

Enzima <sup>1</sup>	MAC (Wasem et al., 1991)	MTBC (Ohman y Ridell, 1995)	MTBC (Kremer et al., 1999)	<i>M. ulcerans</i> <i>M. marinum</i> (Stinear et al., 2000)	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> (Yarkus et al., 2001)
Malato DH	X	X	X		
6-fosfogluconato DH NADP	X		X		X
Glucosa 6-fosfato DH	X	X	X		
Alcohol DH	X	X	X		
Alanina DH			X		
Diaforasa	X		X		
Indofenol oxidasa (superóxido dismutasa)	X	X	X	X	
Nucleosido fosforilasa	X		X		
Transaminasa Glutámico-oxalacética	X		X		X
Adenilato kinasa	X	X	X	X	X
Fosfoglucomutasa	X		X		X
Esterasa	X		X		X
Leucina aminopeptidasa	X	X	X		
Fumarasa	X	X	X		
Aconitasa	X	X	X		
Fosfoglucoasa isomerasa	X		X		
Isocitrato DH	X	X	X		
Catalasa	X	X			
Peroxidasa	X	X			
Arilsulfatasa	X				
ARNr 16S				X	
Chaperonina				X	
Proteína de unión a la fibronectina				X	
Sikimato DH				X	
Polifosfato kinasa				X	
Aspartato aminotransferasa		X			
Glucosa 6P isomerasa		X			
Lactato DH		X			

<sup>1</sup> DH: deshidrogenasa; Los genes/enzimas en negrita son polimórficos

El análisis de estos genes está ampliamente estandarizado para otras especies bacterianas mediante el análisis de la secuencia de múltiples *loci* (*multilocus*

*sequence typing*, MLST) (Maiden *et al.*, 1998) como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* o *Campylobacter jejuni* ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). Sin embargo, el estudio de estas enzimas en el género *Mycobacterium* se ha realizado mediante la movilidad electroforética de las mismas (*multilocus enzyme electrophoresis*, MEE), y se ha centrado en micobacterias no productoras de tuberculosis, señalando las especies crecedoras rápidas *M. abscessus* y *M. chelonae* (Yakrus *et al.*, 2001), y otras crecedoras lentas incluidas en el complejo *M. avium* (Wasem *et al.*, 1991), *M. marinum* o *M. ulcerans* (Stinear *et al.*, 2000). En todas ellas la variabilidad alélica fue alta. Los genes estudiados para realizar estudios epidemiológicos en el género *Mycobacterium* han variado dependiendo de las especies, aunque todos han presentado alguna variación en sus secuencias o en la movilidad de sus enzimas (Tabla 7). El estudio de estos genes en los miembros de MTBC ha sido muy reducido (Ohman y Ridell, 1995; Kremer *et al.*, 1999) y debido a la escasa variabilidad entre los aislados de una misma especie no se han considerado como un buen método de variabilidad genética. Sin embargo hay que tener en cuenta que el uso de esta técnica en una amplia selección de aislados de *M. bovis* no se ha realizado hasta el momento.

## 6.5. Técnicas basadas en la detección de las secuencias diana

### 6.5.1. Análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción

El análisis de los polimorfismos generados mediante restricción enzimática (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) se basa en la digestión de todo el ADN bacteriano seguido de la separación de los fragmentos resultantes mediante electroforesis. Debido al gran número de bandas que se obtienen, la interpretación de los resultados es con frecuencia muy difícil. Por ello se suele realizar empleando sondas dirigidas a secuencias repetidas en el ADN de la bacteria a analizar, de forma que las bandas que se detecten posteriormente sean sólo las que contengan esa secuencia diana. Así, la técnica que se realiza se denomina hibridación Southern. Tras la electroforesis los fragmentos de ADN ya separados se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa y se unen a esa membrana, principalmente mediante una exposición a rayos ultravioleta. Por último, esos fragmentos se hibridan con la sonda elegida, que ha sido previamente marcada, de forma que se obtiene un patrón de bandas que corresponde con las copias que existen de la secuencia diana en el genoma bacteriano.

El empleo de las secuencias de inserción ha demostrado una gran utilidad en este sentido, simplificando la interpretación de los resultados pero conservando su buen poder de discriminación. En el caso de MTBC la secuencia de inserción más usada como sonda es **IS6110** y la digestión se lleva a cabo con la enzima *PvuII*. El número de copias de esta secuencia en *M. tuberculosis* es bastante alto llegando incluso a 25 copias con al menos seis copias en la mayoría de los aislados (Thierry *et al.*, 1990; McAdam *et al.*, 1990). El grado de polimorfismo de esta IS ha posibilitado que la técnica IS6110-RFLP sea considerada como la técnica de referencia (*gold standard*) para la realización de estudios de epidemiología molecular de tuberculosis en humanos (van Soolingen *et al.*, 1995). Aunque algunos autores han descrito la presencia de un elevado número de copias de IS6110 en *M. bovis* aislados de

ganado vacuno y caprino (Liébana *et al.*, 1997) y en animales salvajes o preservados en zoológicos (van Soolingen *et al.*, 1994), la mayoría de los aislados de *M. bovis* se caracterizan por tener una única copia de IS6110, localizada en el locus DR, o en su totalidad menos de 5-6 copias (Collins *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1994; Aranaz *et al.*, 1996b; Cousins *et al.*, 1998b; Kremer *et al.*, 1999; Serraino *et al.*, 1999). Por lo tanto, como la variabilidad reside en el número de copias de la secuencia IS6110, esta técnica ofrece poco interés para la mayoría de los aislados de *M. bovis* y no se suele usar para la caracterización molecular de los mismos.

Debido a la escasa discriminación ofrecida por la sonda dirigida a la detección de IS6110 en aislados de *M. bovis*, van Soolingen y colaboradores llevaron a cabo un estudio en 99 aislados de MTBC (22 *M. bovis* y 9 *M. bovis* BCG), tomando como sonda un fragmento de la secuencia de inserción **IS1081**. De los 22 aislados de *M. bovis* incluidos en el estudio inicial, 18 de ellos presentaron el mismo patrón de restricción más frecuente en los aislados de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, el número de polimorfismos observado fue limitado y la discriminación de esta técnica para los aislados de MTBC fue menor que usando la sonda IS6110 (van Soolingen *et al.*, 1992). En otro estudio, Collins y colaboradores usaron ambas sondas (IS6110 e IS1081) para tipar 160 aislados de *M. bovis* y 6 aislados de *M. bovis* BCG. IS1081-RFLP agrupó todas las cepas de *M. bovis*, a excepción de una, en un único perfil, y las cepas avirulentas (*M. bovis* BCG) en otro distinto (Collins *et al.*, 1993). Al usar la sonda IS6110 los patrones de restricción obtenidos fueron 15, estando incluidas el 75% de las cepas en dos perfiles. Esta agrupación de los aislados en un número reducido de perfiles también fue confirmado por otros autores (Skuce *et al.*, 1994; Aranaz *et al.*, 1998). Como ya ha sido comentado previamente, la aplicación de IS1081 ha permitido la diferenciación de la cepa *M. bovis* BCG respecto al resto de aislados estudiados incluidos dentro de MTBC, ya que presenta un perfil único (van Soolingen *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993).

El uso de la técnica RFLP para la caracterización de aislados de MTBC usando como sonda **MPTR** ha sido escaso, debido a que los resultados encontrados al analizar un panel de 15 aislados de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG ofrecieron un patrón de restricción limitado, aunque se observaron patrones capaces de diferenciar los aislados de *M. africanum* del resto de MTBC (Hermans *et al.*, 1992). Un grado mayor de polimorfismos fue obtenido al analizar 29 cepas de *M. gordonae* y *M. kansasii*, por lo que la sonda MPTR parece ser útil para la diferenciación de varios aislados de estas especies (Hermans *et al.*, 1992). El estudio de esta región también se ha llevado a cabo mediante la técnica de PCR seguido de un análisis de restricción enzimática (PCR-REA). De las 92 cepas estudiadas pertenecientes a MTBC únicamente se diferenciaron los aislados de *M. africanum* (Frothingham, 1995).

El uso de **PGRS** como sonda llegó a considerarse una importante herramienta para diferenciar las cepas de *M. bovis*. La técnica PGRS-RFLP se recomienda cuando se requiere una máxima diferenciación entre cepas y el número de copias de IS6110 es reducido. Sin embargo, la técnica resulta bastante difícil y, por consiguiente, se pueden obtener resultados variables, incluso con personal experimentado. A diferencia de IS6110, la digestión del ADN se realiza con la enzima *AluI*. Según un estudio realizado por Skuce y colaboradores sobre 210 aislados de *M. bovis*, el número de patrones de restricción obtenidos mediante la técnica RFLP usando como



sondas IS6110, DR y PGRS fue similar (17, 18 y 18, respectivamente) pero combinando las tres sondas se identificaron un total de 39 perfiles diferentes (Skuce *et al.*, 1996). Estudios posteriores realizados sobre 273 aislados de *M. bovis*, demostraron un mayor número de perfiles de restricción usando como sonda PGRS (77 perfiles), siendo mucho más discriminativo que la sonda IS6110 (23 perfiles), DR (35 perfiles) o la técnica DVR-spoligotyping (35 perfiles) (Cousins *et al.*, 1998a). Esta misma conclusión se alcanzó en el estudio de comparación de varias técnicas llevado a cabo en Irlanda (Costello *et al.*, 1999). El hecho de que esta sonda detecte el mayor número de perfiles se debe a que estos elementos de repetición se encuentran distribuidos por todo el genoma, mientras que la sonda DR se restringe a un único *locus*. Sin embargo, debido a la complejidad de los patrones obtenidos y a la mala resolución de las bandas por debajo del tamaño de 1,5-2 kb, la mayoría de los estudios limita el análisis de los fragmentos y por tanto de los patrones, superior a este rango (Cousins *et al.*, 1998a). A pesar de ello, el uso de PGRS está asegurado en los estudios de comparación y discriminación de los métodos de caracterización molecular de *M. bovis* (Kremer *et al.*, 1999; Costello *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2009).

Otra de las secuencias restringidas a MTBC es el *locus* DR. El uso de este fragmento como sonda para un análisis de los fragmentos de restricción obtenidos mediante RFLP comenzó en la década de los 90, realizándose varios estudios comparativos entre el uso de distintas sondas. En la práctica totalidad de los estudios la sonda DR ofreció un grado de diferenciación limitado en comparación con otras sondas (Gutiérrez *et al.*, 1995; Skuce *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1996). En el caso de comparar la discriminación de esta técnica con el espigotipado, Cousins y colaboradores observaron unos resultados similares, lo que concuerda con el hecho de que la diana de ambas técnicas se encuentra en el mismo *locus* del genoma (Cousins *et al.*, 1998a). Sin embargo estudios posteriores realizados sobre aislados de Sudamérica (Zumárraga *et al.*, 1999) y en Madagascar (Rasolofo Razanamparany *et al.*, 2006) mostraron que DR-RFLP es capaz de distinguir más tipos de cepas que la técnica de espigotipado. Es importante destacar que en el caso de obtener un número de perfiles similar entre DR-RFLP y la técnica de espigotipado, esta última técnica es la recomendada debido a que el desarrollo de la misma es más sencillo y los resultados son fáciles de interpretar.

Como resumen de la técnica RFLP diremos que los principales inconvenientes que presenta esta técnica residen en 1) la alta cantidad de ADN requerida, 2 µg de ADN, por lo que es necesaria la realización de subcultivos de la cepa a tipar durante un periodo de 3-8 semanas, lo que conlleva el retraso en la tipificación de los aislados; 2) el tiempo de obtención de los resultados, ya que sumado al subcultivo de las cepas se une el tiempo necesario para la realización de la técnica, alrededor de 5 días; 3) la formación y especialización del personal de laboratorio; y 4) la comparación de los resultados intra e interlaboratorios, ya que requiere unos programas de análisis adecuados.

#### 6.5.2. Polimorfismo en los fragmentos de restricción mediada por PCR

Esta técnica, de muy reciente diseño, se basa en la digestión del genoma bacteriano empleando dos enzimas, una con un punto de restricción frecuente y otra

con pocas dianas de restricción. En el caso de MTBC las enzimas frecuentemente usadas son *EcoRI* y *MseI*. A los extremos de los fragmentos digeridos se acoplan unos adaptadores que serán reconocidos por una serie de oligonucleótidos complementarios a estas regiones flanqueantes. Posteriormente se realiza una amplificación mediante reacciones de PCR (*amplified fragment length polymorphism*, **AFLP**). Los fragmentos obtenidos se pueden visualizar en geles de poliacrilamida o en un secuenciador automático de ADN. En el caso de usar oligonucleótidos marcados con fluoróforos la visualización de los fragmentos amplificados será más sencilla, pasando a llamarse la técnica en este caso FAFLP (*fluorescent amplified fragment length polymorphism*).

El uso de esta técnica para *M. bovis* ha sido mínimo y parece restringido a *M. tuberculosis* y a otras especies pertenecientes al género *Mycobacterium*, principalmente aquellas del complejo *Mycobacterium avium* (O'Shea *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2007). En el estudio de variabilidad interespecie e intraespecie llevado a cabo por Huys y colaboradores, la técnica AFLP agrupó las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en un mismo grupo (MTBC), y en otro distinto las cepas de *M. ulcerans*, por lo que el uso de esta técnica se acota con un fin meramente taxonómico en la diferenciación de las tres especies (Huys *et al.*, 2000). A esta misma conclusión se llegó en un estudio realizado con varios aislados de las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. pinnipedii* (Ahmed *et al.*, 2003). En la misma línea, la discriminación aportada por AFLP sobre 50 aislados de *M. tuberculosis* fue menor que con IS6110-RFLP, aunque la combinación de ambas técnicas dio buenos resultados en aislados con un elevado número de copias de IS6110, pero sin embargo no diferenciaba los aislados con pocas copias de IS6110 (Krishnan *et al.*, 2007).

#### 6.5.3. Unión rápida mediada por PCR

El método de genotipado denominado unión rápida mediada por PCR (*fast ligation-mediated PCR*, **FLiP**) se basa en la digestión del ADN genómico con la enzima *HhaI*, y posterior ligado de un conector (*linker*), previamente amplificado, a los fragmentos generados (Reisig *et al.*, 2005). A continuación se amplifican todos los fragmentos mediante reacciones de PCR, habiendo sido diseñados previamente los oligonucleótidos específicos de los conectores. Al igual que en la técnica RFLP, la interpretación de los resultados es con frecuencia muy difícil debido al gran número de bandas que se producen. Por ello se suele realizar empleando sondas dirigidas a secuencias repetidas en el ADN de la bacteria a analizar, de forma que las bandas que se detecten posteriormente sean sólo las que contengan esa secuencia diana. Los productos amplificados se visualizan en un gel de poliacrilamida y las bandas se transfieren a una membrana de nylon, la cual se hibrida con un oligonucleótido que contiene parte de la secuencia de inserción IS6110.

La base de esta técnica es muy parecida a RFLP, con la diferencia de que se puede partir de una concentración de ADN mucho menor que en el caso de RFLP (aproximadamente una concentración 1000 veces menor), ya que se realiza una amplificación de los fragmentos generados. La sensibilidad de esta técnica se determinó realizando diluciones del ADN genómico de la cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv entre 10 ng/ $\mu$ l y 10 fg/ $\mu$ l. La mínima concentración de ADN para obtener una

lectura perfecta de la huella genética fue 10 pg/μl. Además la especificidad de esta técnica es del 100% ya que únicamente se observó amplificación en las cepas pertenecientes a MTBC y en ningún caso en las excluidas de este grupo.

La reproducibilidad de esta técnica se ha valorado en varios estudios realizados sobre cepas de MTBC mediante la duplicidad de algunas muestras (Kremer *et al.*, 2005; Reisig *et al.*, 2005). En ambos estudios el porcentaje de reproducibilidad de esta técnica fue del 97%. Además, la variabilidad genética ofrecida por FLiP e IS6110-RFLP sobre 131 muestras analizadas de MTBC demostró una capacidad de discriminación ligeramente menor mediante FLiP (81 perfiles) que IS6110-RFLP (84 perfiles).

En resumen, la discriminación que ofrece esta técnica para MTBC es similar a IS6110-RFLP, ya que ambas se basan en los polimorfismos generados a partir de las copias de la secuencia de inserción IS6110. Por este mismo motivo, las limitaciones de FLiP son prácticamente las mismas que todos los métodos basados en la detección de IS6110: la comparación entre distintas cepas se basa en patrones de reconocimiento y el método no ofrece suficiente información cuando el número de copias de esta secuencia de inserción es inferior a cinco o para cepas que no presenten ninguna copia.

#### 6.5.4. Unión mediada por PCR

La unión de fragmentos mediada por PCR (*ligation-mediated PCR*, **LM-PCR**) se basa en la amplificación de la secuencia adyacente al extremo 5' de la secuencia de inserción IS6110 (Prod'hom *et al.*, 1997). Previamente se realiza una restricción con la enzima de restricción Sall y se une un adaptador (*linker*) a los extremos de los fragmentos de restricción, seguido de una amplificación.

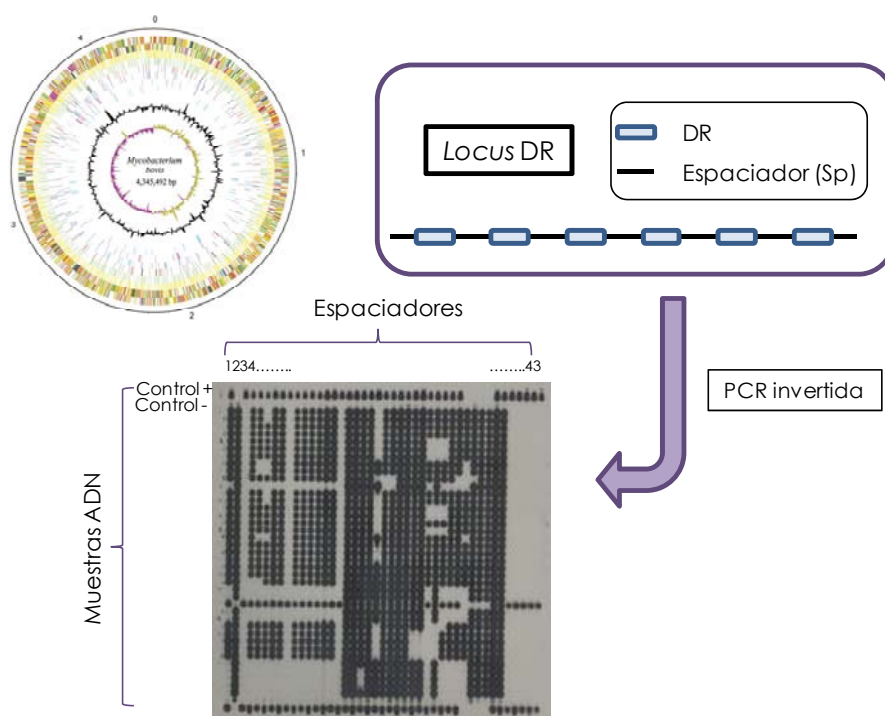
La discriminación que se obtiene con esta técnica en aislados de MTBC es inferior a IS6110-RFLP (Prod'hom *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2005), ya que no en todos los casos se produce la detección de todas las secuencias de inserción. Sin embargo esta técnica se considera muy útil como método de investigación para hacer un seguimiento de contactos o identificación de contaminaciones cruzadas en los laboratorios de micobacteriología clínica, debido a que es una técnica simple y reproducible y la cantidad de ADN necesaria para el tipado de las cepas es mucho menor que para la técnica RFLP.

#### 6.5.5. Espoligotipado

El espoligotipado (*direct variable repeats-spacer oligonucleotide typing*, **DVR-spoligotyping**) está basado en los polimorfismos del locus DR. Como se ha comentado previamente, este locus es específico de MTBC (Kamerbeek *et al.*, 1997) y está formado por dos tipos de secuencias cortas: unas secuencias denominadas DR (*direct repeats*) que son todas ellas idénticas y de un tamaño de 36 bp, separadas por otras secuencias llamadas espaciadores entre 34 y 41 bp. La diferencia entre dos aislados reside en la presencia/ausencia de estos espaciadores (Figura 8).

El primer paso de esta técnica es la amplificación de los espaciadores usando un par de oligonucleótidos específicos de los extremos de las secuencias DR. Uno de los oligonucleótidos está marcado con una enzima (biotina) que permite la

detección de los productos amplificados. El segundo paso tiene como objetivo revelar qué espaciadores se han amplificado para cada aislado. Ello implica la hibridación de los espaciadores amplificados a una membrana a la que están unidos covalentemente los oligonucleótidos correspondientes a 43 espaciadores. La presencia de un espaciador se visualiza con la presencia de un punto usando un método de revelado. El genotipo resultante se da en un formato binario (1 = presencia de espaciador; 0 = ausencia de espaciador) que ha permitido la construcción de bases de datos que pretenden facilitar la identificación del origen de un aislado clínico en particular. Este código binario puede ser transformado en el código octal o hexadecimal con el que trabajan las bases de datos más importantes de espiligotipado de aislados de MTBC.



**Figura 8.** Esquema del *locus* DR y de la técnica de espiligotipado

Aunque el espiligotipado ofrece una menor discriminación que IS6110-RFLP para las cepas con un número de copias de la secuencia de inserción superior a seis, como por ejemplo la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*, este resultado se invierte cuando el número de copias de IS6110 es bajo, como en el caso de *M. bovis*/*M. caprae*. Por lo tanto, esta técnica es la más usada en los laboratorios de caracterización molecular de *M. bovis*. La principal ventaja que posee es la escasa dificultad que ofrece la puesta a punto en los laboratorios como técnica de caracterización molecular rutinaria para los aislados de *M. bovis*. Además, al ser una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa es sencilla de desarrollar y la cantidad de ADN necesaria es mínima en comparación con la técnica RFLP, por lo que el tiempo de obtención de los resultados se ve reducido. La asignación de los perfiles es visual, ya que la presencia/ausencia de los espaciadores se refleja con un

punto y, por tanto, los perfiles pueden ser fácilmente interpretables. A esto se le une la estandarización de la técnica, lo que permite la comparación de los resultados entre laboratorios (ver apartado 6.7, Base de datos).

El espoligotipado permite, por una parte, la identificación de los miembros de MTBC ya que algunos espaciadores están siempre ausentes para algunas especies (Kamerbeek *et al.*, 1997; Niemann *et al.*, 2000b; Viana-Niero *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2009a). Por ejemplo, *M. africanum* no presenta los espaciadores 8, 9 y 39; y en el caso de *M. bovis*, los espaciadores 3, 9, 16 y 39-43 están siempre ausentes (Tabla 8). Por lo tanto, la presencia/ausencia de espaciadores se ha tenido muy en cuenta en los estudios de evolución de MTBC (ver apartado 2.11, Evolución del complejo *M. tuberculosis*). Durante décadas muchos autores han especulado sobre los mecanismos responsables de los polimorfismos en el locus DR. Varios estudios sobre la región DR en cepas relacionadas de *M. tuberculosis* han concluido que la tendencia de esta región es principalmente la pérdida de un único DVR o varios DVRs contiguos en relación a un patrón ancestral que presentara todos los espaciadores (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000). La segunda hipótesis de su variabilidad fue la posibilidad de recombinación homóloga entre los DRs adyacentes o lejanos (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998) o mutaciones por errores en la replicación del ADN (*slippage*), lo que puede llevar a la aparición de DVRs duplicados. La tercera hipótesis fue la transposición o inserción de la secuencia IS6110, hecho que facilita la recombinación entre estas secuencias y que conlleva una pérdida de DVRs colindantes a la misma en bloque (Warren *et al.*, 2002). Aunque la delección de las secuencias DVR parece ser aleatoria existe cierta preferencia en la delección de DVRs situados en la región 5' del elemento de inserción IS6110, es decir, entre los DVR 1 y DVR 24 (Warren *et al.*, 2002). En el caso de *M. bovis*, los espaciadores situados en la región 5' de esta secuencia de inserción son menos frecuentes y, por lo tanto, más polimórficos (Caimi *et al.*, 2001).

Esta reorganización de los espaciadores ha servido también para realizar estudios sobre la variación entre los aislados de un mismo brote, los aislados obtenidos de un mismo animal o paciente o incluso las distintas variantes obtenidas mediante subcultivo de una cepa en el laboratorio, como ha sido el caso de la cepa *M. bovis* BCG (Zhang *et al.*, 1995; van Embden *et al.*, 2000). A estas últimas variantes procedentes de un aislado clínico y que han mutado de forma natural por sucesivos pases en un laboratorio se le conoce como cepas isogénicas. La pérdida de un DVR fue detectada mediante esta técnica tras cinco subcultivos en el laboratorio de una cepa salvaje de *M. tuberculosis* (Aranaz *et al.*, 2004b). Diversos estudios sobre la variación genética de los aislados de un mismo brote o de un mismo paciente a lo largo del tiempo han mostrado la delección o inserción (duplicidad) de un único o varios DVRs consecutivos, hecho que se ha producido mediante un único evento genético (Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002).

En función de estas variaciones en los DVR, el espoligotipado se considera una buena técnica de **genotipado** de MTBC. Desde los años 90, el espoligotipado ha sido la técnica complementaria de elección para los aislados de MTBC en Salud Pública, siendo considerada IS6110-RFLP la técnica de referencia para el genotipado de *M. tuberculosis*. Sin embargo, para *M. bovis* es la técnica de elección para la realización de estudios moleculares. Para determinar la discriminación aportada por esta técnica

aplicada a los aislados de MTBC actualmente se aplica el índice de discriminación de Hunter y Gaston, que tiene en cuenta el número de perfiles generados por la técnica en estudio y la frecuencia con la que se encuentra cada uno de ellos (Hunter y Gaston, 1988; Hunter, 1990). Este índice establece un valor  $D$  entre 0 y 1, siendo 1 la máxima discriminación.

**Tabla 8.** Perfiles de espoligolipos característicos de los miembros del complejo *M. tuberculosis*

Especie	Perfil	Ausencia de espaciadores
M. tuberculosis	Ghana LAM Harlem Cameroon Dehil Beijing	33-36 21-24, 33-36 31, 33-36 23-25, 33-36 4-7, 23-34 1-34
M. africanum	West african 1 West african 2	8-12, 21-24, 37-39 7-9, 39
M. microti		1-3, 8-22, 39-43
M. pinipiedi		1-3, 8-22, 27, 28, 39-43
M. bovis		3, 9, 16, 39-43
M. caprae		1, 3-16, 28, 39-43
M. canethi		Todos excepto 30 y 36

La discriminación que ofrece esta técnica para los aislados de *M. bovis* varía en función de su distribución geográfica. En Europa, la diversidad genética de esta técnica depende en buena parte del país; así el espoligotipado ofrece una buena discriminación en países mediterráneos como Italia (Boniotti *et al.*, 2009), Francia (Haddad *et al.*, 2001), Portugal (Duarte *et al.*, 2008) o España (Rodríguez *et al.*, 2010) (Tabla 9). Sin embargo, la escasa diversidad genética que ofrece para los aislados de Inglaterra o Irlanda del Norte, tanto a nivel de perfiles como de diferenciación de cepas incluidas en un determinado perfil (Costello *et al.*, 1999; Skuce *et al.*, 2005; Veterinary Laboratories Agency, 2005) ha dado lugar al uso de otras técnicas más discriminatorias.

En algunas ocasiones la discriminación del espoligotipado es muy pobre, como son los ejemplos anteriormente comentados en Reino Unido y, por lo tanto, el estudio de las relaciones entre los aislados de *M. bovis* se ve comprometido. Esto puede ser debido a que la selección de los espaciadores incluidos en la membrana de espoligotipado se realizó inicialmente sobre una base de cepas de MTBC, no siendo en muchas ocasiones los espaciadores más apropiados para la diferenciación de las cepas de *M. bovis* (van der Zanden *et al.*, 2002).

**Tabla 9.** Estudios de frecuencia de espoligotipos y discriminación de la técnica realizados en Europa

País	Años	Nº aislados <sup>1</sup>	Nº perfiles	D	Perfil más prevalente (%)	Especie animal
España	1992-2007	6215	252	0,87	SB0121 (27,94) SB0120 (11,21) SB0339 (8,06)	<i>Bos taurus</i> (5585) <i>Capra aegagrus hircus</i> (33) <i>Sus scrofa</i> (204) <i>Cervus elaphus</i> (141) <i>Dama dama</i> (229) Otros (23)
Gran Bretaña	1987-2005	9839	34	0,79	SB0140 (35,90) SB0263 (23,60) SB0673 (12,99)	<i>Bos taurus</i> (9839)
Irlanda del Norte	1993-1998	452	20	0,53	SB0140 (51,80) SB0130 (15,27)	<i>Bos taurus</i> (233) <i>Meles meles</i> (173) Otros (46)
Italia	2000-2006	1560	81	0,70	SB0120 (54,60) SB0134 (5,7) SB0841 (4,8)	<i>Bos taurus</i> (1560)
Portugal	2002-2007	293	29	0,90	SB0121 (26,29) SB0119 (9,29)	<i>Bos taurus</i> (258) <i>Capra aegagrus hircus</i> (8) <i>Cervus elaphus</i> (21) <i>Sus scrofa</i> (6)

<sup>1</sup> Aislados no relacionados excepto en Francia, en la cual se desconoce el dato (Haddad *et al.*, 2001)

Una posible solución a este problema ha sido el diseño de una membrana de espoligotipo de segunda generación, en la que se ha estudiado la variabilidad que aportan otros espaciadores distintos a los 43 que presenta la membrana actual. Varios autores han descrito hasta un total de 104 espaciadores en el locus DR en

estudios realizados con aislados de MTBC (van Embden *et al.*, 2000; Caimi *et al.*, 2001; van der Zanden *et al.*, 2002). En el estudio realizado en 2002 sobre un total de 407 aislados de MTBC, el número de perfiles aumentó de 184 con la membrana actual (43 espaciadores) a 208 con la membrana de segunda generación (104 espaciadores). El mayor aumento se observó en los aislados de *M. bovis*. La recomendación de estos autores fue el uso de la membrana de segunda generación en aquellos casos en los que fuese necesario obtener una mayor discriminación, como por ejemplo cepas con un reducido número de copias de IS6110 o para estudios filogenéticos del genotipo Beijing.

#### 6.5.6. Análisis de las repeticiones en tándem de múltiples *loci*

El análisis del número de repeticiones en tándem de múltiples *loci* [*multi-locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis*, MLVA] está basado en la detección de regiones polimórficas repetidas de forma consecutiva a lo largo del genoma bacteriano. Muchas de estas secuencias presentan hipervariabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones y/o con la variabilidad entre las secuencias. Al igual que la técnica *DVR-spoligotyping*, MLVA es una técnica basada en la PCR. Los marcadores a analizar se amplifican usando diferentes pares de oligonucleótidos para cada marcador. Actualmente existen dos técnicas distintas para caracterizar los alelos presentes en cada aislado. La primera requiere una electroforesis en geles de agarosa, en la que se determina el número de repeticiones de cada *locus*, basándose en el tamaño de banda obtenido para cada aislado (Figura 9). En el segundo caso se realiza una técnica automatizada, basada en el uso de un analizador que detecta fluorescencia, y permite el análisis simultáneo de PCRs múltiples. En este caso, uno de los oligonucleótidos de cada par se marca previamente con distintas sondas fluorescentes para permitir la lectura de cada *locus* en un secuenciador (Supply *et al.*, 2001).

El primer estudio de VNTR realizado en el género *Mycobacterium* se llevó a cabo por Zang y colaboradores (Goyal *et al.*, 1994; Zhang y Young, 1994). Los autores encontraron una secuencia de 75 pb repetida en tándem en aislados de *M. tuberculosis*, que a su vez estaba flanqueada por MPTRs. Además de diferenciar los aislados estudiados en varios grupos se cuestionó su posible funcionalidad ya que estaba presente en un marco de lectura abierto. Posteriormente vieron que los marcadores MIRU-VNTR están dispersos en el genoma bacteriano, principalmente en regiones intergénicas, por lo que su implicación en el funcionamiento de la bacteria se presupone nula. No obstante, algunos MIRU-VNTR suelen ubicarse en la zona inmediatamente anterior o "*upstream*" de algunos ORFs, encontrándose en la misma dirección que éstos. Estas repeticiones en tándem podrían contener elementos de regulación, tales como codones de iniciación (ETR-D) o la secuencia consenso de unión del ribosoma (ETR-E); por lo tanto el número de repeticiones de estos *loci* podría influir en la expresión de los genes contiguos. Por otra parte, algunas de estas repeticiones se encuentran en zonas codificantes (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998). En este caso, si los ORFs expresasen el ADN repetido en tándem codificarían una serie de aminoácidos de algunas proteínas, como es el caso del QUB 11a, implicado en la codificación de la proteína de la familia PPE34 (Skuce *et al.*, 2002). Del mismo modo otros *loci*, tales como QUB 11b, QUB 18, QUB 23, y QUB 26, también



se encuentran en los marcos de lectura abiertos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Skuce *et al.*, 2002). Todos los *loci* encuadrados en regiones codificantes tienen repeticiones que son múltiplos de tres nucleótidos. En bacterias patógenas, los VNTRs presentes en zonas codificantes aumentan potencialmente las variaciones en las proteínas de superficie implicadas en patogenicidad, que podrían ayudar al patógeno a evadirse de la respuesta del sistema inmune del hospedador. Un ejemplo de esto es la forma de regulación de algunos genes (variación de fase) en bacterias como *Escherichia coli* o *Haemophilus influenzae* (Hood *et al.*, 1996; Torres-Cruz y van der Woude, 2003).

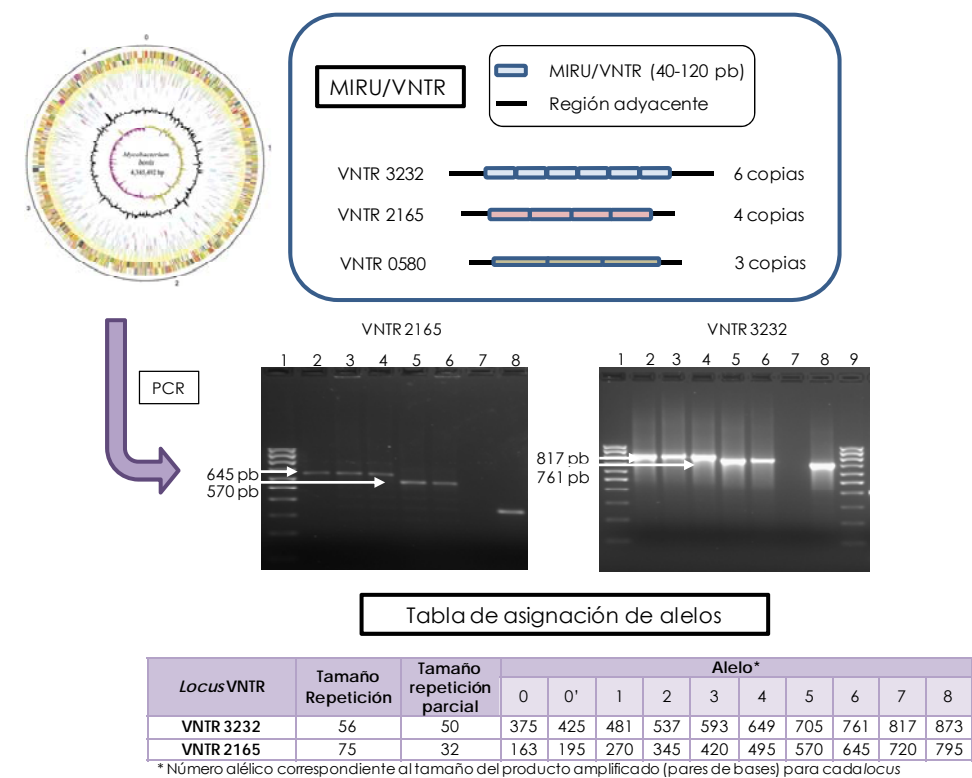


Figura 9. Esquema de la realización de la técnica MIRU/VNTR

Varios autores han estudiado la especificidad y sensibilidad de esta técnica (Magdalena *et al.*, 1998b; Kremer *et al.*, 1999; Supply *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2005). Según los estudios realizados sobre un total de 90 cepas de MTBC y 10 cepas no pertenecientes a MTBC la especificidad fue del 100%. Del mismo modo, todas las cepas de MTBC fueron tipables al amplificar los 12 *loci* incluidos en el estudio, que fueron MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 y 40. Atendiendo a la reproducibilidad de resultados que ofrece esta técnica se observaron valores entre el 97% y el 100% (Supply *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2005), pudiendo equipararse en todos los casos a la técnica de referencia IS6110-RFLP.

Entre los distintos grupos de *loci* MIRU-VNTR descritos para el tipado de los aislados de *M. tuberculosis* (Goyal *et al.*, 1994; Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998;

Magdalena *et al.*, 1998a; Magdalena *et al.*, 1998b; Le Fleche *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2005) existe actualmente un sistema basado en 12 *loci* ampliamente usados e integrados en los sistemas de control de la tuberculosis en humanos a escala internacional (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2001) (Tabla 10). El uso de esta técnica como primera línea de tipificación en combinación con el espoligotipado proporciona una discriminación adecuada en la mayoría de los casos a gran escala. Sin embargo, el genotipado de la secuencia de inserción IS6110 sigue siendo necesario como método adicional para tipificar los aislados incluidos en el mismo grupo en algunos casos, cuando los datos epidemiológicos o demográficos no proporcionan las claves de la existencia o ausencia de vínculos entre los pacientes.

En el año 2006, Supply y colaboradores sugirieron un lote alternativo de 24 MIRU-VNTRs para mejorar la discriminación de estos aislados no relacionados. El estudio se realizó sobre 824 aislados de MTBC. En lo que respecta a la selección de 90 aislados del MTBC, se obtuvo una máxima resolución de 89 perfiles con un número mínimo de 9 marcadores (MIRU 4, 10, 16, 26, 40, y VNTR 0577, 2163b, 2165 y 4052). A pesar de ello, dieron la opción de usar también 12 ó 15 *loci* en función de la discriminación ofrecida en cada estudio (Supply *et al.*, 2006) (Tabla 10). Gracias a estos análisis que incluyen principalmente aislados de *M. tuberculosis*, la técnica MLVA está estandarizada y los resultados se pueden comparar con otros laboratorios a nivel internacional. Sin embargo, los estudios realizados con aislados de *M. bovis* son más escasos aunque esta técnica ha sido utilizada en diversos países para realizar estudios epidemiológicos (Roring *et al.*, 2002; Skuce *et al.*, 2002; Roring *et al.*, 2004; Skuce *et al.*, 2005; Allix *et al.*, 2006; Aranaz *et al.*, 2004a; Boniotti *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010). A pesar de ello, parece que a nivel europeo existe un consenso sobre los *loci* que ofrecen mayor discriminación y sobre el uso mínimo de los 6 *loci* más polimórficos para la tipificación de *M. bovis*, como son VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, QUB 11a, QUB 26 y MIRU 4 (Supply, 2006). A pesar de que la estandarización de esta técnica para *M. bovis* está todavía pendiente se ha sugerido el uso de estos *loci*, a los que se puede sumar una selección de marcadores discriminatorios adicionales dependiendo de la localización geográfica de esos aislados. El orden de los *loci* en el que se deben reflejar los perfiles obtenidos mediante MIRU-VNTR tampoco está establecido, lo que dificulta en gran medida la comparación de los aislados entre las distintas publicaciones.

Los estudios de caracterización molecular de aislados de *M. caprae* son aún más escasos que los de *M. bovis* y tampoco existe una selección estándar de referencia de marcadores MIRU-VNTR. El análisis de cepas más amplio llevado a cabo hasta el momento fue realizado en el año 2005. Prodinger y colaboradores escogieron un panel de 232 aislados de *M. caprae* y seleccionaron como método de tipificación el espoligotipado y 12 MIRUs (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 y 40). De todos ellos los *loci* que ofrecían una mayor discriminación fueron MIRU 4, 10, 16, 26 y 31 (Tabla 10), marcadores que no se corresponden con los más polimórficos para la especie *M. bovis* (Prodinger *et al.*, 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio únicamente fueron usados marcadores MIRU y no se escogieron aquellos marcadores VNTR que presentan más variación para *M. bovis*, como son VNTR 3232, QUB 11a, QUB 11b, QUB 26, ETR-A o ETR-B. Por lo tanto, sería

necesario realizar estudios con estos *loci* para comprobar si ofrecen una buena diversidad entre los aislados de *M. caprae*.

**Tabla 10.** Marcadores MIRU-VNTR recomendados según la bibliografía para los aislados del complejo *M. tuberculosis*

Locus VNTR	MIRU-VNTR Alias	Longitud (pb)	(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998) <sup>1</sup> 6 loci	(Supply et al., 2001) <sup>2</sup> 12 loci	(Roring et al., 2004) <sup>3</sup> 10 loci	(Prodinger et al., 2005) <sup>4</sup> 5 loci	(Supply et al., 2006) <sup>5</sup> 24 loci	(Supply et al., 2006) <sup>5</sup> 15 loci	(Supply et al., 2006) <sup>5</sup> 12 loci	(Allix et al., 2006) <sup>3</sup> 9 loci	(Allix et al., 2006) <sup>3</sup> 6 loci	(Supply, 2006) <sup>3</sup> 6 loci	(Bonioti et al., 2009) <sup>3</sup> 13 loci
0154	MIRU 2	53					X						
0580	MIRU 4 ETR-D	77	X	X		X	X	X		X		X	
0960	MIRU10	53		X		X	X	X	X				
1644	MIRU 16	53		X		X	X	X	X				
2059	MIRU 20	77		X			X						
2531	MIRU 23	53		X			X						
2687	MIRU 24	54		X	X		X						
2996	MIRU 26	51		X	X	X	X	X	X	X	X		X
3007	MIRU 27 QUB 5	53		X			X						
3192	MIRU 31 ETR-E	53	X	X		X	X	X	X				X
4348	MIRU 39	53		X			X						
0802	MIRU 40	54		X			X	X	X				X
0424	Mtub04	51		X			X	X	X				
0577	ETR-C	58	X				X	X	X	X			
2165	ETR-A	75	X		X		X	X	X	X	X	X	X
2401	Mtub30	58					X	X					
3690	Mtub39	58					X	X	X				
4156	QUB 4156	59					X	X		X			
2163b	QUB 11b	69			X		X	X	X	X	X		X
1955	Mtub21	57					X	X	X				
4052	QUB 26	111			X		X	X	X			X	X
2347	Mtub29	57					X						
2461	ETR-B	57	X		X		X			X	X	X	X
3171	Mtub34	54					X						
3232	QUB 3232	56/57			X					X	X	X	X
2163a	QUB 11a	69			X					X	X	X	X
-	ETR-F	79	X										
3336	QUB 3336	59			X								X
1895	QUB 1895	57			X								X
3155	QUB15	54											X
1612	QUB 23	21											X

<sup>1</sup> Complejo *M. tuberculosis*; <sup>2</sup> *M. tuberculosis*; <sup>3</sup> *M. bovis*; <sup>4</sup> *M. caprae*; <sup>5</sup> Complejo *M. tuberculosis* (principalmente *M. tuberculosis*).

Por último hay que destacar la importancia que tiene la existencia de una tabla que correlacione el número de copias de cada *locus* con el tamaño de banda obtenido (*allele calling table*). A cada número de copias se le asigna un alelo (1, 2, 3...), y esa numeración será la que forme parte del perfil de cada aislado caracterizado por esta técnica. En la actualidad estas tablas proceden de los estudios realizados previamente y, además de indicar el tamaño de las copias en cada *locus*, también especifican las repeticiones parciales de los mismo, algo que se tiene en cuenta al establecer la relación entre el número de copias y los pares de bases obtenidas (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2001; Roring *et al.*, 2002).

#### 6.6. Estudios epidemiológicos basados en técnicas moleculares

Además del conocimiento aportado por las técnicas de caracterización molecular sobre la variabilidad genética de una población determinada, la tipificación de aislados de *M. bovis* ha permitido la realización de estudios epidemiológicos que han facilitado el seguimiento de diversos brotes de la tuberculosis bovina entre animales de la misma especie o entre especies, incluyendo los animales salvajes y el hombre. Cientos de estudios han sido publicados sobre su utilidad en este campo y han permitido establecer una relación entre los casos de tuberculosis bovina. La aparición de los mismos perfiles de espoligos en distintas explotaciones ganaderas o en distintas especies ha puesto de relieve la importancia de las herramientas de biología molecular para la detección de brotes relacionados.

Durante las últimas décadas la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados con aislados de *M. bovis* han seleccionado como técnicas de elección el espoligotipado, y más recientemente MLVA. En áreas geográficas en las que conviven poblaciones de animales domésticos y salvajes se ha demostrado la infección de ambos grupos con la misma cepa de *M. bovis*. Por ejemplo, Aranaz y colaboradores estudiaron varias especies de animales salvajes distribuidos en siete localizaciones del centro-sur de España (Aranaz *et al.*, 2004a). Mediante la técnica de espoligotipado observaron que los aislados recogidos en aquellas poblaciones en las que convivían animales domésticos y salvajes compartían los espoligotipos, observando en las especies salvajes los espoligotipos más prevalentes hallados en el ganado bovino de esa zona y que además, permanecía invariables a lo largo del tiempo. Estos hallazgos indican una relación epidemiológica entre ambas poblaciones que pudieran estar infectándose mutuamente o mediante la existencia de una fuente de infección común. Sin embargo, el problema de las técnicas de caracterización molecular es que no determinan la dirección de la transmisión.

Para determinar el flujo de la transmisión no son suficientes los datos epidemiológicos obtenidos de las herramientas moleculares, sino que es imprescindible tener en cuenta la epidemiología tradicional como las encuestas epidemiológicas, la observación de lesiones macroscópicas o el comportamiento y los hábitos de las distintas especies animales. En España, otros muchos estudios epidemiológicos han demostrado la transmisión entre animales domésticos y salvajes gracias al uso del espoligotipo y MLVA (Gortázar *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2008). En el Parque Nacional Kruger (KNP) y el Parque Hluhluwe-iMfolozi,

situados en África, la existencia de la tuberculosis bovina en el búfalo africano se conoce desde la década de los 80. Diversas encuestas y muestreos han evidenciado una prevalencia de la tuberculosis bovina en el búfalo de hasta el 90% al sur del KNP (de Vos *et al.*, 2001), destacando que estos parques están rodeados en su mayoría por pastos comunales de ganado bovino infectado. La transmisión de la infección del búfalo a otros animales salvajes también ha sido descrita, incluyendo especies depredadoras, herbívoros y omnívoros (Bengis *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2006). El genotipo más prevalente (73%) entre un total de 156 aislados de 8 especies distintas de animales salvajes también fue identificado en una explotación ganadera próxima al KNP mediante IS6110-RFLP, PGRS-RFLP y espiligotipado (Michel *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2009). Como ya se ha comentado anteriormente, la discriminación que ofrece el espiligotipado es limitada en algunos países o poblaciones infectadas, y esta técnica no aporta la información necesaria para establecer relaciones entre los distintos brotes de la infección. Tal es el caso de Reino Unido y la República de Irlanda, o para aquellos perfiles con altas prevalencias en determinados países, como los espiligotipos SB0120 en Italia y Francia, el SB0121 en Portugal y España, o el SB0140 en Reino Unido. En estos casos el uso de los marcadores MIRU-VNTR ha permitido diferenciar los aislados agrupados en estos perfiles. En Italia, por ejemplo, el 54,6% de los aislados de *M. bovis* están incluidos en el espiligotipo SB0120. Esto querría decir que todos estos aislados podrían considerarse la misma cepa. Sin embargo, al aplicar la técnica MLVA sobre una selección de 100 aislados bovinos con este perfil y estudiando 24 *loci*, se obtuvieron 89 perfiles MIRU-VNTR distintos repartidos en nueve grupos, y en el que se establecieron relaciones epidemiológicas entre los brotes de la infección (Boniotti *et al.*, 2009). Un estudio similar ha sido realizado recientemente en Portugal con una selección de aislados del espiligotipo más prevalente en ese país (SB0121, 26,3%) de procedencia bovina principalmente (Duarte *et al.*, 2008). De un total de 70 aislados se obtuvieron 44 perfiles de MIRU-VNTR al amplificar 8 *loci* (Duarte *et al.*, 2010). El análisis combinado del movimiento de animales y el genotipado mediante MIRU-VNTR permitió en este caso hacer un seguimiento de las explotaciones infectadas. El hallazgo del mismo genotipo en explotaciones ganaderas cercanas, sin evidencias de movimiento de animales entre ellas, indica una posible fuente de infección común al tratarse de explotaciones con prácticas de manejo extensivas que permitan el contacto estrecho entre animales. En algunas ocasiones estas explotaciones también estaban relacionadas con la aptitud de la explotación, observando un mayor número de brotes en aquellas en las que existía una mayor entrada de animales (por ejemplo las de aptitud cárnica), ya que presentan un mayor movimiento de animales que puede favorecer la entrada de infecciones.

El uso de estas técnicas de caracterización molecular ha servido también para estudiar una posible fuente de infección animal en un brote de tuberculosis en humanos debido a *M. bovis* en Reino Unido (Evans *et al.*, 2007). Los seis aislados presentaron el mismo perfil mediante espiligotipado y VNTR. Éste se correspondía con el segundo espiligotipo más prevalente en vacuno en Reino Unido. En esta ocasión se llegó a la conclusión de que la infección en este grupo de personas llegó a través de un primer contacto con un paciente que trabajó en una explotación ganadera años atrás.

La aparición de nuevas cepas que proceden de clones preexistentes mediante la pérdida de espaciadores de la región DR se puede considerar procesos de microevolución. Este proceso ha sido propuesto por diversos autores (van Embden *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003).

Como ya se ha comentado el uso de las técnicas de caracterización molecular ha permitido conocer la transmisión de la tuberculosis bovina entre los animales domésticos y salvajes. Además, algunos estudios han mostrado la existencia de perfiles de espigotipo únicos en los animales de vida libre, como en jabalíes, ciervos y gamos (Duarte *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010). En estos casos se ha especulado sobre la posible adaptación y evolución de las bacterias por la introducción en otra especie animal aunque no ha sido demostrado. Por ejemplo, el hallazgo en África de un genotipo aparentemente derivado del patrón más prevalente en el búfalo ha sido aislado únicamente del gran kudú (Michel *et al.*, 2009).

### 6.7. Bases de datos

La recogida de toda la información relativa a los aislados de MTBC, tanto aquella derivada de los estudios de epidemiología clásica como molecular, es esencial para el establecimiento de relaciones entre los brotes de tuberculosis y el estudio de la enfermedad. Con este objetivo se han creado varias bases de datos internacionales y nacionales.

La base de datos internacional **SpolDB4**, dirigida por el Instituto Pasteur en Guadalupe (Brudey *et al.*, 2006), recoge el mayor número de aislados del complejo *M. tuberculosis* tipificados mediante espigotipado. Hasta el año 2006 esta base de datos recogía un total de 1939 perfiles de espigotipo (*Spoligotyping International Type, SIT*) y englobaba 35.925 aislados, recogidos de 122 países. Se encuentra disponible la información correspondiente a cada aislado, como puede ser el año de aislamiento, el país de aislamiento, procedencia de origen del paciente, la especie de MTBC, el espigotipo, la sensibilidad antibiótica del aislado, o el nombre del investigador. La peculiaridad de esta base de datos es que también incluye los perfiles MIRU-VNTR (*VNTR International Type, VIT*) obtenidos mediante la técnica MIRU-VNTR. Este perfil MIRU-VNTR puede presentar varias combinaciones de *loci*, siempre anotados en el siguiente orden: 5 *loci* (ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E) (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998), 12 *loci* (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40) (Supply *et al.*, 2001), 15 *loci* (MIRU 4, 10, 16, 26, 31, 40, ETR-A, ETR-C, QUB 11b, QUB 26, QUB 4156, Mtub04, Mtub21, Mtub30, Mtub39) (Supply *et al.*, 2006) o 24 *loci* (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40; ETR-A, ETR-B, ETR-C; QUB 11b, QUB 26, QUB 4156; Mtub04, Mtub21, Mtub29, Mtub30, Mtub34, Mtub39) (Supply *et al.*, 2006) (Tabla 10). Gracias a toda la información relativa a los aislados, esta base de datos es muy útil para realizar estudios de poblaciones y epidemiológicos, y conocer la diversidad genética de MTBC a nivel mundial. Con un propósito similar ha sido diseñada la base de datos internacional de reciente creación **MIRU-VNTRplus** (Allix-Béguec *et al.*, 2008), una base multifuncional para el análisis directo de MTBC mediante su identificación filogenética y/o genotipado (IS6110-RFLP, espigotipado, MIRU-VNTR, RDs, SNPs, susceptibilidad a los antibióticos, o una combinación de todos ellos).

Sin embargo, en lo que a la Sanidad Animal se refiere, la utilidad de SpolDB4 está limitada ya que está focalizada principalmente a los aislados de origen humano, siendo en su mayoría la especie *M. tuberculosis*. Con la idea de estandarizar la nomenclatura de aquellas especies incluidas en MTBC pero sin la región RD9 (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*), y establecer una referencia internacional que incluyese la caracterización molecular de estos aislados surgió la base de datos para los espoligotipos de *M. bovis* en el año 2003, denominada **Mbovis.org** y está dirigida por la Universidad de Sussex, Falmer, en Reino Unido. A cada perfil se le asigna un número SBXXXX (del inglés "spoligotype of the *M. bovis* clone"), así como un código hexadecimal. En la actualidad esta base de datos recoge un total de 1360 perfiles de espoligo. Aunque la información relativa a los aislados no es tan exhaustiva como en la base de datos de *M. tuberculosis*, sí que existen unos datos mínimos como son la especie animal de la que se ha aislado, el año de aislamiento, la procedencia, y si existe una publicación que haga referencia al mismo. En definitiva, esta nomenclatura unificada favorece la comparación de resultados del espoligotipado en un laboratorio e interlaboratorios, pudiendo hacer un seguimiento de los aislados en cada momento.

Además de las ventajas de las bases de datos internacionales, en España se creó en 2007 una base de datos de micobacteriosis animal denominada **mycoDB**. El principal objetivo de esta base de datos es la recopilación de los datos epidemiológicos de los aislados de *M. bovis*/*M. caprae* a nivel nacional, incluyendo unos datos mínimos, como son especie animal, localización geográfica, año de aislamiento, y el perfil de espoligotipado de cada cepa. Este proyecto surge gracias a la colaboración entre el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid. Esta base de datos recoge los registros nacionales de micobacteriosis animal desde 1996 hasta la actualidad y es una excelente herramienta epidemiológica que facilita la trazabilidad de infecciones producidas por micobacterias y, por tanto, el control de la tuberculosis en animales. La utilidad de mycoDB radica en los distintos criterios de consultas como son el año de aislamiento del agente patógeno, la especie animal o espoligotipo implicado. Además estos datos se complementan con un visor que muestra la distribución geográfica de los aislamientos de micobacterias. A diferencia de las bases de datos internacionales, el acceso a mycoDB está restringido a los Servicios Veterinarios y Laboratorios que participan en el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina, y se realiza a través de la página web de la Red de Alerta Sanitaria (RASVE) del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

# **OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**





## OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La erradicación de la tuberculosis bovina es en la actualidad el objetivo final de cualquier programa de lucha contra la enfermedad en los países desarrollados y, a nivel de la Unión Europea, constituye una prioridad esencial, tanto para la protección de la Salud Pública frente a esta enfermedad zoonótica como para el buen funcionamiento del mercado intracomunitario de animales vivos y sus productos, así como para el aumento de la productividad. Para lograr esta erradicación es indispensable la mejora en las herramientas de diagnóstico y control de la infección y, aún más si cabe, la realización de estudios epidemiológicos que establezcan posibles relaciones entre los distintos brotes, tanto entre los animales domésticos como entre éstos y los animales salvajes.

El objetivo global de esta tesis es el estudio epidemiológico de la tuberculosis bovina en mamíferos, tanto en animales domésticos como salvajes, mediante el diagnóstico de la infección por métodos de cultivo microbiológico, así como la caracterización molecular de los aislados obtenidos en el estudio; todo ello para un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad, incluyendo su diseminación y la sensibilidad antibiótica y, en especial, el papel que la fauna salvaje puede tener en el mantenimiento de la misma.

Para una mejor exposición desde el punto de vista didáctico este objetivo global se ha subdividido en tres capítulos:

CAPÍTULO I. Estudio epidemiológico de la tuberculosis en ganado bovino y animales salvajes mediante cultivo microbiológico y caracterización molecular de los aislados.

CAPÍTULO II. Diseño y aplicación de las técnicas de caracterización molecular como herramienta epidemiológica en aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de origen animal y humano.

CAPÍTULO III. Estudio de la sensibilidad antibiótica de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de origen animal y humano frente a los fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis en humanos.

A continuación se incluyen los artículos encuadrados en cada uno de estos capítulos que han sido la base para la realización de esta memoria, así como una pequeña introducción de la idea central que permitió la realización de estos estudios.

### CAPÍTULO I

Este capítulo recoge la importancia que tiene la realización de los estudios epidemiológicos para mejorar el conocimiento sobre la tuberculosis en animales domésticos y salvajes a distintos niveles. El primer nivel es el diagnóstico de la infección mediante el cultivo microbiológico de las muestras, lo que nos permite aislar y posteriormente identificar al agente etiológico del complejo *M. tuberculosis*, así como conocer la diseminación de los aislados y la prevalencia de la infección de la zona en estudio. Aunque *M. bovis* es el principal

microorganismo causante de la tuberculosis en animales, varias cepas de *M. tuberculosis* también se han aislado en ganado bovino y en este capítulo reseñamos la excepcionalidad de estos hallazgos. El segundo nivel es la caracterización molecular de los aislados, que permite establecer vínculos epidemiológicos entre los ellos.

- Beatriz Romero, Alicia Aranaz, Ángel Sandoval, Julio Álvarez, Lucía de Juan, Javier Bezos, Celia Sánchez, Margarita Galka, Pilar Fernández, Ana Mateos, Lucas Domínguez. **Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation** (Persistencia y evolución molecular de la población de *Mycobacterium bovis* aislada de ganado bovino y animales salvajes en el Parque Nacional de Doñana detectada mediante variación genotípica. Artículo publicado en *Veterinary Microbiology*, 2008; 132: 87–95.
- Beatriz Romero, Sabrina Rodríguez, Javier Bezos, Rosa Díaz, M. Francisca Copano, Isabel Merediz, Olga Mínguez, Sergio Marqués, José Luis Sáez, Ana Mateos, Alicia Aranaz, Lucas Domínguez, Lucía de Juan. **Humans as the source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle**. (El hombre como fuente de la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* en ganado bovino). Artículo enviado al *Emerging Infectious Diseases*.

## CAPÍTULO II

Este capítulo recoge la necesidad de emplear técnicas de caracterización molecular para la realización de estudios epidemiológicos que permitan trazar de forma eficaz los vínculos entre los distintos brotes. Con este objetivo, estudiamos varios aislados del complejo *M. tuberculosis*, de origen animal y humano, mediante espoligotipado, MLVA, secuenciación del locus DR, y/o el diseño y puesta a punto de una membrana de segunda generación con nuevos espaciadores del locus DR. Todo ello para establecer la existencia o no de una posible relación epidemiológica entre los aislados y estudiar la utilidad y discriminación de estas técnicas para los aislados el complejo *M. tuberculosis*.

- Alicia Aranaz, Beatriz Romero, Natalia Montero, Julio Álvarez, Javier Bezos, Lucía de Juan, Ana Mateos, Lucas Domínguez. **Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain** (Cambio en el espoligotipo debido a una delección de una repetición directa en una cepa isogénica de laboratorio de *Mycobacterium tuberculosis*). Nota publicada en *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42: 5388-5391.
- Beatriz Romero, Alicia Aranaz, Javier Bezos, Julio Álvarez, Lucía de Juan, Ana Mateos, Enrique Gómez-Mampaso, Lucas Domínguez. **Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals**

(Epidemiología molecular de aislados de *Mycobacterium bovis* multirresistentes con el mismo espoligotipo que aislados de procedencia animal). Nota publicada en *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; 44: 3405-3408.

- M. Tariq Javed, Alicia Aranaz, Lucía de Juan, Javier Bezos, Beatriz Romero, Julio Álvarez, Cristina Lozano, Ana Mateos, Lucas Domínguez. **Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain** (Mejora del espoligotipado con espaciadores adicionales para la caracterización de aislados españoles de *Mycobacterium bovis* y *M. caprae*). Artículo publicado en *Tuberculosis (Edinburg)*, 2007; 87: 437-445.

### CAPÍTULO III

Este capítulo resalta la importancia de los miembros del complejo *M. tuberculosis* como agentes zoonóticos y, por ende, el problema que pueden suponer en Salud Pública. De ahí la importancia de controlar la sensibilidad antibiótica de estos aislados animales que se pueden transmitir al hombre, a pesar de la prohibición del tratamiento de esta enfermedad en animales. Debido a la escasez de información a nivel mundial relativa a la sensibilidad antibiótica de los aislados del complejo *M. tuberculosis* de origen animal consideramos esencial realizar este estudio mediante dos métodos: uno basado en el antibiograma mediante el método de las proporciones, y otro basado en la detección mediante secuenciación de mutaciones en genes asociados a la resistencia antibiótica.

- Beatriz Romero, Alicia Aranaz, Javier Bezos, Julio Álvarez, Lucía de Juan, Tariq M. Javed, Ana Mateos, Enrique Gómez-Mampaso, Lucas Domínguez. **Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals** (Sensibilidad antibiótica de aislados españoles del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de origen animal). Artículo publicado en *Tuberculosis (Edinburg)*, 2007; 87: 565-571.
- Beatriz Romero, Alicia Aranaz, Javier Bezos, Julio Álvarez, Lucía de Juan, Ana Mateos, Enrique Gómez-Mampaso, Lucas Domínguez. **Single-nucleotide polymorphism in two representative multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates collected from patients in a Spanish hospital harboring a human infection outbreak** (Polimorfismos de un solo nucleótido en dos aislados representativos de *Mycobacterium bovis* multirresistentes procedentes de pacientes de un brote en un hospital en España). Carta al editor publicada en *Journal of Clinical Microbiology*, 2008; 46: 826-827.

Además de los trabajos citados, los resultados obtenidos en el transcurso de la presente tesis doctoral han permitido la realización de otro estudio adicional, que aún

se encuentra en fase de redacción. Este estudio se integra en el capítulo II, y estudia la discriminación que ofrecen distintas técnicas moleculares sobre una selección de aislados del complejo *M. tuberculosis*. En el resumen del correspondiente capítulo se ofrece un esbozo de los resultados obtenidos, a la espera de finalizar la redacción del mismo.

# **CAPÍTULO I**

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS  
EN GANADO BOVINO Y ANIMALES SALVAJES MEDIANTE  
CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR DE LOS AISLADOS



## RESUMEN

La capacidad que tiene *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), principal agente causal de la tuberculosis bovina, para infectar distintas especies animales tanto de índole doméstica como salvaje ha quedado demostrada en numerosos estudios. Los programas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino han conseguido una reducción de la prevalencia de la infección en España. Sin embargo, el papel que desempeña la fauna salvaje en la epidemiología de la tuberculosis está siendo ampliamente estudiado debido a que puede afectar a la eficacia de los programas de erradicación. Los animales salvajes que entran en contacto de forma directa o indirecta con los animales domésticos pueden introducir o mantener la infección en una explotación. Este contacto entre los animales de abasto y los de vida libre puede estudiarse en espacios naturales protegidos en los que conviven ambos grupos y en los que el ganado está sometido a los programas de erradicación y no existe control de la tuberculosis en los animales salvajes.

Debido a la repercusión que pueden tener las especies salvajes en las campañas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino se diseñó un estudio con el objetivo de conocer la prevalencia de la tuberculosis mediante la confirmación de la enfermedad por cultivo microbiológico en los animales salvajes y domésticos de una zona geográficamente restringida, así como estudiar la epidemiología de la población de *M. bovis* que está afectando tanto al ganado bovino como a los animales salvajes mediante técnicas de caracterización molecular. El estudio se llevó a cabo en el Parque Nacional de Doñana, espacio natural con un elevado valor ecológico concienciado con el bienestar animal y la conservación de la biodiversidad, en el cual se produjo un aumento del ganado bovino en los años 90. Esta investigación se realizó durante un periodo de seis años (1998-2003) sobre un total de 1.209 animales domésticos (N=678) y salvajes (N=531), tanto artiodáctilos (ciervo, gamo, jabalí; N=516) como carnívoros (zorro



lince ibérico; N=15). Mediante cultivo microbiológico se detectaron 163 animales infectados por *M. bovis*, estando infectados el 7,96% (54/678) de las vacas, y el 20,53% (109/531) de los animales salvajes. La técnica de espigotipado reveló 9 perfiles distintos, siendo los perfiles más prevalentes el SB1232 y SB1230 (77,30% y 15,34% de los animales infectados, respectivamente). Debido a que en algunas ocasiones esta técnica no ofrece una discriminación suficiente de los aislados de *M. bovis* se realizó también un análisis mediante 8 marcadores MIRU-VNTR sobre un panel de 92 aislados que incluía los 9 espigotipos. Mediante esta técnica se obtuvieron 8 perfiles que, en su mayoría, agrupaban varios espigotipos en un mismo patrón MIRU-VNTR. Los resultados obtenidos mediante la combinación de ambas técnicas moleculares corroboraron que los animales salvajes estaban infectados con las cepas más prevalentes en el ganado bovino y, además, confirmó la persistencia de estas cepas a lo largo de todo el estudio. A pesar de que la discriminación del espigotipado y MIRU-VNTR fue similar, la variación genotípica observada entre los aislados mediante la combinación de ambas técnicas sugirió varios eventos de microevolución en la población de *M. bovis* en este área. Además, el análisis mediante MIRU-VNTR permitió la detección de una doble infección en un jabalí y una vaca causada por los dos espigotipos más prevalentes en la zona. Como conclusión podríamos decir que este estudio realizado en el Parque Nacional de Doñana expone de forma clara el riesgo de introducir animales domésticos en zonas históricamente dedicadas a la fauna salvaje cuando no se puede garantizar la ausencia de la tuberculosis, el uso de las técnicas de diagnóstico y unas medidas de control adecuadas.

Al igual que *M. bovis* se considera el principal causante de tuberculosis en los animales, *M. tuberculosis* es el agente etiológico por excelencia que causa la infección en humanos. La transmisión de la infección de los animales al hombre es una de las características fundamentales asociadas a la tuberculosis bovina (zoonosis) debido a los problemas de Salud Pública que puede generar. Sin embargo se ha tenido poco en cuenta la transmisión de la enfermedad de la población humana a los animales y, en especial, al ganado bovino, ya que *M. tuberculosis* se considera un patógeno casi exclusivo del hombre. El último estudio encuadrado en este capítulo incluye la detección de la infección por *M. tuberculosis* en tres explotaciones ganaderas mediante el sistema de medio líquido automatizado BACTEC MGIT 960. Los sistemas de cultivo líquido automatizados están perfectamente integrados en los laboratorios de Salud Pública como herramienta de diagnóstico de la tuberculosis desde hace años, mientras que su implantación y aplicación en los laboratorios veterinarios es más reciente. Las tres cepas de *M. tuberculosis* fueron aisladas de un único animal por explotación y a partir del aislamiento se identificó y se caracterizó la especie mediante el espigotipado, obteniendo tres perfiles distintos (SIT 2537, SIT 1564 y SIT 58). La respuesta inmunológica a la infección tuberculosa fue positiva en dos de los tres animales, y ninguna de las muestras tomadas presentó lesiones compatibles con tuberculosis. Además, los tres animales infectados tenían una edad inferior a nueve meses. Se llevó a cabo un exhaustivo estudio epidemiológico con el fin de establecer el origen de la infección. En los tres brotes se encontró una asociación con el personal enfermo de la explotación que presentaba una tuberculosis activa, siendo de distintas nacionalidades. Únicamente se estableció una relación epidemiológica mediante espigotipado en uno de los casos (SIT 2537), con la repercusión adicional de ser un aislado multirresistente (isoniazida y

rifampicina). Según los datos publicados hasta la fecha, estos tres brotes de *M. tuberculosis* en el ganado bovino son los primeros hallados en España, y especulamos que el aislamiento está relacionado con el uso del sistema de cultivo MGIT 960. Estos medios líquidos tienen una sensibilidad superior a los sistemas de cultivo sólido y, por lo tanto, son capaces de detectar un menor número de bacilos y en un tiempo más corto. A esto hay que sumarle que estos medios fueron diseñados para el aislamiento de *M. tuberculosis* y, por lo tanto, su crecimiento se ve favorecido. También se resalta la importancia del buen diseño de las campañas de erradicación que permiten la detección de esta infección, por lo que es probable que la infección en las vacas por *M. tuberculosis* estuviera en los estadios iniciales. Finalmente se hace mención a la importancia que tiene la cooperación entre los sistemas de Sanidad Animal y Salud Pública para reducir el riesgo de transmisión y luchar frente a la tuberculosis.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Veterinary Microbiology 132 (2008) 87–95

veterinary  
microbiology[www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation

Beatriz Romero<sup>a</sup>, Alicia Aranaz<sup>a,\*</sup>, Ángel Sandoval<sup>a,1</sup>, Julio Álvarez<sup>a</sup>,  
Lucía de Juan<sup>a</sup>, Javier Bezos<sup>a</sup>, Celia Sánchez<sup>b,2</sup>, Margarita Galka<sup>b,3</sup>,  
Pilar Fernández<sup>c</sup>, Ana Mateos<sup>a</sup>, Lucas Domínguez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Sanidad Animal, VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Parque Nacional Doñana, Ministerio de Medio Ambiente, C.A. El Acebuche, Matalascañas, 21760 Huelva, Spain<sup>c</sup> Área de Ecología, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14017 Córdoba, Spain

Received 22 February 2008; received in revised form 16 April 2008; accepted 23 April 2008

### Abstract

The role of wildlife in tuberculosis epidemiology is being widely studied since it can affect the effectiveness of eradication campaigns in cattle. The health problem is enhanced when it concerns also wildlife welfare and biodiversity conservation. This study was performed to understand the epidemiology of *Mycobacterium bovis* population affecting livestock and wild animals in the Doñana National Park using bacteriology and molecular characterisation techniques. Tuberculosis research was performed on 1209 cattle and wild animals (artiodactyla and carnivore) collected over 6 years in the Park. One hundred and sixty-three animals were found to be infected with *M. bovis*, comprising 7.96% of the cattle and 20.53% of the wild animals tested. Spoligotyping revealed nine patterns, being SB1232 and SB1230 the most prevalent (77.30% and 15.34% of infected animals, respectively). MIRU-VNTR analysis of a selected panel of 92 isolates showed eight different profiles, including several spoligotypes within the same MIRU-VNTR profile. The discriminatory capacity of both techniques in this panel was similar. The results obtained by combination of both techniques corroborate that wildlife species are infected with the *M. bovis* strains which are more prevalent in cattle and reveal their persistence. Genotype variation between isolates strongly suggests micro-evolutionary events in the *M. bovis* population in the same area. This study in the Doñana National Park exposes the risk of introduction of domestic animals into wildlife areas when there is not a warranty of disease freedom, appropriate diagnostic techniques and control measures.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*; Cattle; Wild animals; DNA fingerprinting; Molecular evolution

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943721; fax: +34 91 3943795.

E-mail address: [alaranaz@vet.ucm.es](mailto:alaranaz@vet.ucm.es) (A. Aranaz).

<sup>1</sup> Present address: Ordway Research Institute, Inc., Albany, NY 12208, USA.

<sup>2</sup> Present address: Subdirección General de Sanidad Animal, MAPA, 28071 Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Present address: Clínica Veterinaria Noé Montequinto, Dos Hermanas, 41089 Sevilla, Spain.

## 1. Introduction

Tuberculosis in wildlife, caused mainly by *Mycobacterium bovis*, has been reported worldwide (Livingstone, 2000; Bengis et al., 2002; Corner, 2006). The first concern about involvement of feral animals was their role in tuberculosis transmission, limiting the effectiveness of eradication campaigns in cattle. For example, in the UK and the Republic of Ireland, maintenance of bovine tuberculosis has been attributed to the presence of infected badgers (*Meles meles*) (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000; Carter et al., 2007), and in Michigan (USA) the re-emergence of tuberculosis in cattle is thought to have been due to a reservoir in white-tailed deer (O'Brien et al., 2002). On the other hand, this disease has an enormous impact on wildlife welfare and biodiversity conservation which has been disregarded frequently, and even threatens endangered and emblematic species (Briones et al., 2000; Michel et al., 2006). Moreover, tuberculosis is also a zoonotic disease that can be transmitted by aerosols, skin abrasions or consumption of uncooked products (Winters et al., 2005; Evans et al., 2007).

In Spain, recent studies support the role of artiodactyls as wild hosts of tuberculosis. Red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and the European wild boar (*Sus scrofa*) are game species with the highest densities in the Iberian Peninsula that have been found to be infected with *M. bovis* (Aranaz et al., 2004a; Parra et al., 2006; Vicente et al., 2006; Martín-Hernando et al., 2007; Naranjo et al., 2008).

Molecular epidemiology tools can provide a valuable insight into the importance of different hosts in the maintenance and spread of the infection although the information obtained cannot indicate a route of transmission. Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats (MIRU-VNTR) have been proposed as an alternative (Skuce et al., 2005; Allix et al., 2006) to the spoligotyping method (Kamerbeek et al., 1997) because the latter has low discrimination power when *M. bovis* isolates are closely related to each other (Cousins et al., 1998; Skuce et al., 2002). However MIRU-VNTR analysis is not yet standardised in *M. bovis* and allelic diversity can vary among countries.

The aim of this report was to study the epidemiology of *M. bovis* in livestock and wild

animals in the Doñana National Park. We used spoligotyping and MIRU-VNTR typing in order to compare their efficiency to discriminate between *M. bovis* isolates and to gain an insight into its route of transmission between wild and domestic animals within a restricted closed geographical area over a long period of time.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

This study was performed in the Doñana National Park, located in western Andalucía (south of Spain) (<http://whc.unesco.org/en/list/685>). During 1998–2003, samples from 1209 animals were collected in the National Park (Table 1), comprising domestic cattle (*Bos taurus*) ( $n=678$ ) and wild animals ( $n=531$ ) [red deer (*C. elaphus*) ( $n=168$ ), fallow deer (*D. dama*) ( $n=134$ ), wild boar (*S. scrofa*) ( $n=214$ ), Iberian lynx (*Lynx pardinus*) ( $n=10$ ), and fox (*Vulpes vulpes*) ( $n=5$ )]. Cattle in this study were animals that used to graze in the Park. They were slaughtered in the 2002–2003 period, as part of tuberculosis surveillance coupled to massive reduction of the excessive number of grazing animals for conservational reasons. Wild animals were captured, necropsied and sampled during the health monitoring programme routinely developed at the Park from 1988 that considerably increased from 2001 to 2003. Wild artiodactyla were randomly hunted by the staff of the Park by active surveillance. Carnivores were found dead or terminally ill.

Necropsies were performed by veterinarians in the field on wild animals and in the slaughterhouse on cattle. Whenever possible, samples consisted of retropharyngeal/mandibular, mediastinal/bronchial, portal and mesenteric lymph nodes, lung and liver that were collected at the post-mortem examination. A minor group of these samples ( $n=136$ ) have been included in a preliminary study (Aranaz et al., 2004a).

### 2.2. Bacteriology

A pool of tissues from each animal were homogenized with sterile distilled water and decontaminated with 0.35% hexadecylpyridinium chloride

Table 1  
Results of bacteriological culture and spoligotyping patterns of *Mycobacterium bovis* isolates cultured from cattle ( $n = 678$ ) and wild animals ( $n = 531$ ) in the Doñana National Park

Animal species	Number of animals	Positive culture	Species (number of positive cultures)	Spoligotypes (number. of isolates)
Cattle ( <i>Bos Taurus</i> )	678	66	<i>M. bovis</i> (54)	SB0120 (1), SB0134 (2), SB0822 (3), SB0950 (1), SB1230 (10), SB1232 (34), SB1233 (1), SB1234 (2)
			<i>Mycobacterium</i> spp. (12)	
Red deer ( <i>Cervus elaphus</i> )	168	36	<i>M. bovis</i> (26)	SB1230 (2), SB1232 (24)
			<i>Mycobacterium</i> spp. (10)	
Fallow deer ( <i>Dama dama</i> )	134	35	<i>M. bovis</i> (17)	SB1230 (1), SB1232 (16)
			<i>Mycobacterium</i> spp. (18)	
Wild boar ( <i>Sus scrofa</i> )	214	70	<i>M. bovis</i> (60)	SB0950 (1), SB1230 (11), SB1232 (48)
			<i>Mycobacterium</i> spp. (10)	
Iberian lynx ( <i>Lynx pardinus</i> )	10	4	<i>M. bovis</i> (4)	SB0295 (1), SB1232 (3)
Fox ( <i>Vulpes vulpes</i> )	5	2	<i>M. bovis</i> (2)	SB1230 (1), SB1232 (1)
Total	1209	213	<i>M. bovis</i> (163)	Nine spoligotyping profiles
			<i>Mycobacterium</i> spp. (50)	

A minor group of these samples was included in a previous report (Aranaz et al., 2004a). Spoligotype as defined in the *M. bovis* Spoligotype Database website ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)).

for 30 min (Corner and Trajstman, 1988), centrifuged at 3500 rpm ( $1068 \times g$ ) for 30 min and cultured onto Colestos and 0.2% (w/v) pyruvate-enriched Löwenstein–Jensen media (bioMérieux España and Bio-medics, Madrid, Spain) at 37 °C. Isolates were identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by staining for acid–alcohol fastness, colony morphology and PCR amplification of *Mycobacterium* genus-specific 16S rRNA fragment and MPB70 (Wilton and Cousins, 1992).

### 2.3. Spoligotyping

The *M. bovis* isolates were characterised by spoligotyping as described (Kamerbeek et al., 1997). The amplified product was detected by hybridization of the biotin-labelled PCR product onto spoligotyping membrane (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands). Purified sterile water and a clinical isolate of *M. tuberculosis* and *M. bovis* were included as controls in each batch of tests. The patterns were allocated a number in the *M. bovis* spoligotyping database. The results were recorded in SB (spoligotype bovis) code, followed by a

field of 4 digits as defined on the *Mycobacterium bovis* Spoligotype Database website ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)).

### 2.4. MIRU-VNTR typing

A representative collection of the isolates ( $n = 92$ ) was subjected to MIRU-VNTR analysis (Table 2). The panel included all isolates ( $n = 12$ ) of the low-frequency spoligotyping patterns, and a selection of isolates ( $n = 80$ ) of the high prevalent spoligotyping patterns which had been isolated throughout the years of the study. The analysis was carried out as described (Roring et al., 2002), and primers previously reported were used to amplify the ETR-A and ETR-B loci (formally VNTR 2165 and VNTR 2461) (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998), MIRU 4 and 40 (VNTR 580 and VNTR 802) (Supply et al., 2000) and QUB 3232, QUB 11a, QUB 11b, QUB 26 (VNTR 3232, VNTR 2163a, VNTR 2163b and VNTR 4052) (Roring et al., 2002; Skuce et al., 2002) using the recommended PCR conditions. Amplicon sizes were estimated by electrophoresis on a 2.5% agarose gel at 45 V during 2 h, using 100-bp ladder (Biotools B&M



Molecular analysis of the panel of 92 *M. bovis* isolates from the Doñana National Park using spoligotyping and MIRU-VNTR techniques

<sup>1</sup>(■) indicates the presence of a spacer, (□) indicates the absence of the spacer. <sup>2</sup>Spoligotype code followed in the *M. bovis* collection at the UCM. <sup>3</sup>Spoligotype as defined in the *M. bovis* Spoligotype Database website ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)).

### 3.2. Spoligotyping

The 163 isolates belonging to *M. tuberculosis* complex were characterised by spoligotyping and were identified as *M. bovis* because of the absence of the spacers 3, 9, 16 and 39–43. They were classified into nine spoligotyping patterns (SB0120, SB0134, SB0295, SB0822, SB0950, SB1230, SB1232, SB1233, SB1234) (Table 1). The most prevalent spoligotype (SB1232) was found in 126 infected animals (77.30%), and the second spoligotype in prevalence was SB1230, including 25 infected animals (15.34%). Both were detected all throughout the time span of this survey, without substantial variation regarding frequency. The other profiles were isolated from significantly fewer animals. The discriminatory capacity of spoligotyping was  $h = 0.38$ .

The spoligotypes SB0950, SB1230 and SB1232 were shared between domestic and wildlife animals (red deer, fallow deer, wild boar, Iberian lynx and fox). On the other hand, the spoligotypes SB0120, SB0134, SB0822, SB1233, and SB1234 were found only in *M. bovis* isolates from cattle.

### 3.1. Bacteriology

From the samples collected in the Doñana National Park from 1209 domestic and wild animals, we isolated *Mycobacterium* spp. from 213 animals: 163 isolates were identified as members of the *M. tuberculosis* complex and 50 isolates were atypical mycobacteria (Table 1). Fifty-four out of 678 cattle (7.96%) and 109 out of 531 wild animals (20.53%)

Table 3

Number of profiles and allelic diversity obtained by MIRU-VNTR analysis and spoligotyping applied to the 92 *M. bovis* isolates of the panel

Locus	Alias	Number of allelic variants <sup>a</sup>	Allelic diversity
QUB 3232	VNTR 3232	3	0.40
ETR-A <sup>b</sup>	VNTR 2165	3	0.42
ETR-B <sup>b</sup>	VNTR 2461	2	0.34
QUB 26 <sup>b</sup>	VNTR 4052	2	0.40
QUB 11a <sup>b</sup>	VNTR 2163a	2	0.08
QUB 11b <sup>b</sup>	VNTR 2163b	3	0.39
MIRU 4	VNTR 0580	2	0.34
MIRU 40	VNTR 0802	2	0.02
QUB 3232 + ETR-A		4	0.42
VNTR 3232 + QUB 11b		4	0.41
VNTR 3232 + MIRU 4		4	0.42
ETR-A + QUB 11b + MIRU 4		7	0.44
All VNTRs		8	0.46
Spoligotyping (including SB0950)		9	0.51
Spoligotyping		8	0.49
Spoligotyping + ETR-A + QUB 11b + MIRU 4		11	0.50
Spoligotyping + all VNTRs		11	0.50

*h*: discriminatory power, measured as the allelic diversity.<sup>a</sup> SB0950 (mixed infection) has been excluded from analysis except when indicated.<sup>b</sup> The isolate with the pattern SB0822 which yielded no band at these loci was excluded from the analysis.

### 3.3. MIRU-VNTR analysis

The selected panel of the isolates ( $n = 92$ ) was characterised by the eight loci MIRU-VNTR analysis (Tables 2 and 3). The discriminatory capacity of spoligotyping in this panel was  $h = 0.51$ . The MIRU-VNTR loci classified the isolates in eight different types. The discriminatory power of the eight individual loci differed greatly, with allelic diversity ranking from 0.02 to 0.42 (Table 3). The six loci with the highest discriminatory power ( $h \geq 0.2$ ) for this local *M. bovis* panel were QUB 3232, ETR-A, ETR-B, QUB 26, QUB 11b and MIRU 4 while the QUB 11a and MIRU 40 loci displayed very few allelic diversity. The VNTR technique was not able to type one of the 92 isolates at the ETR-A, ETR-B, QUB 26, QUB 11a and QUB 11b so this isolate was not taken into account to calculate the discriminatory index at the individual locus. The ability of VNTR typing to distinguish among the *M. bovis* field isolates was marginally improved by combining all MIRU-VNTRs ( $h = 0.46$ ). This allelic diversity was similar to those obtained only with QUB 3232 or ETR-A ( $h = 0.40$  and  $0.42$ , respectively). The level of discrimination was further improved at 11 different allelic profiles when spoligotyping was included in combination with

ETR-A, QUB 11b and MIRU 4 ( $h = 0.50$ ). The addition of results of the other loci did not increase the discriminatory power (Table 3).

Additionally, the MIRU-VNTR analysis of *M. bovis* isolates of spoligotype SB0950, obtained from one cow and a wild boar, showed two PCR amplification bands in six of the loci. These double bands corresponded to those obtained for isolates belonging to spoligotype SB1232 and SB1230 (Table 2). For that reason, both SB0950 isolates were excluded to calculate the discriminatory index.

Moreover, the MIRU-VNTR allelic profile among the isolates with the spoligotyping patterns SB0822, SB1232 and SB1233 was identical (MIRU-VNTR profile 6-4-5-4-11-4-3-2). It also occurred in the case of isolates with spoligotypes SB0134 (one of the isolates) and SB1234 (MIRU-VNTR profile 5-3-5-5-10-3-3-2). On the other hand, the MIRU-VNTR technique distinguished among isolates that belong to spoligotypes SB0134, SB1232 and SB0822 into two MIRU-VNTR subtypes; these strains differed in a single copy at QUB 11b, ETR-A and MIRU 4 and 40, respectively.

*M. bovis* isolates with the same spoligotyping pattern and MIRU-VNTR profile (SB1232, 6-4-5-4-11-4-3-2 and SB1230, 7-6-4-5-11-2-0-2) were shared



by cattle and wild animals, including artiodactyla and carnivore.

#### 4. Discussion

The presence of tuberculosis in a population of wild animals may interfere with the eradication scheme of bovine tuberculosis and raises problems of wildlife management and public health. In this study we used molecular techniques to analyse the *M. bovis* population isolated from livestock and wild animals from the Doñana National Park. The combination of spoligotyping and MIRU-VNTR analysis corroborates that wildlife (artiodactyla, carnivores) is infected with the *M. bovis* strains which are more prevalent in cattle (SB1230 and SB1232) and are maintained in the same area over time.

We hypothesize that *M. bovis* isolates have undergone micro-evolutionary steps. Thus, 64 out of 66 isolates with the patterns SB0822, SB1232 and SB1233 showed the same MIRU-VNTR allelic profile (6-4-5-4-11-4-3-2). The presence of spacers in their patterns would be compatible with one-step micro-evolution (SB0822 → SB1232 → SB1233) based on the loss of a single spacer or a group of contiguous spacers. The original SB0822 may have derived from one isolate of spoligotype SB0120, which contains all spacers described for *M. bovis* and is a widespread pattern in Spain. In a similar way, SB0134 and SB1234 differed among them on a single deletion event of the spacers 31–34; by MIRU-VNTR analysis differed only on the QUB 11b. However, the relationship between the SB0295 and SB1230, which vary in the presence of spacers 8–13 and the MIRU 4, is not clear because the Iberian lynx infected with *M. bovis* pattern SB0295 (not found in other animal species) had been translocated from Sierra Morena (south-east Spain). Therefore we postulate that these are examples of the appearance of new strains that diverged from pre-existing clones, which have lost spacers (van Embden et al., 2000; Smith et al., 2003; Aranaz et al., 2004b).

An exceptional case was the pattern SB0950. The MIRU-VNTR profile of these isolates was the sum of those obtained with the SB1232 and SB1230 patterns, recognising two strains whose overlapping patterns were classified as the SB0950 spoligotype. To our

knowledge, this is the first description of co-infection by *M. bovis* in animals. Mixed infection is rarely considered in humans, and has been associated to high overexposure to tuberculosis (García de Viedma et al., 2003). In our setting, the presence of mixed infections is coherent with likelihood of infection with prevalent clones. An infection with multiple strains may be difficult to detect and the combined use of MIRU-VNTR analysis could be an affordable tool to discriminate mixed strains.

Regarding the overall performance of the typing techniques used in this study, both spoligotyping and MIRU-VNTR analysis displayed similar discriminatory capacity. The diversity of spoligotyping profiles in this area is similar to that found in Spain, however the discriminatory power ( $h = 0.38$ ) is lower than that found at Spanish level (S. Rodríguez, personal communication). To our knowledge, the most frequent spoligotype (SB1232) has not been described in other countries so far, and SB1230 is restricted to the Iberian Peninsula (Duarte et al., 2008). In Spain, both *M. bovis* patterns are restricted to this geographical area.

In the panel of 92 isolates, spoligotyping and MIRU-VNTR techniques offered almost the same usefulness regarding number of allelic variants and discrimination power. However, there are differences in the performance of each locus. According to our results, loci QUB3232 and ETR-A match the main clusters defined by spoligotyping; while a combination of these loci with others with a lower allelic diversity allowed us to obtain a high discrimination. Currently, there is not a definitive international consensus on the best combination of markers. Despite the restricted geographical origin of these isolates, our results could be taken into account for the standardisation of the technique.

Molecular characterisation techniques helped us to track epidemiological links among *M. bovis* isolated from livestock and wild animals. Extensive-management stockbreeding was introduced in the Park to achieve a sustainable agriculture in an attempt to make better use of land resources. In the 1990s, there was a continuous increase in livestock in the Park as a result of agricultural subsidies. We have no clinical samples of feral animals prior to this increase; but the information derived from field necropsies on wild animals revealed no cases of tuberculosis (C. Sánchez, unpublished data). Therefore, it is likely that cattle

infected with bovine tuberculosis, misdiagnosed in the eradication campaigns, introduced the disease within the wildlife population. Our findings do not determine the direction and frequency of the transmission between livestock and wildlife, as it could happen frequently or it could have happened only occasionally with a subsequent transmission among wildlife. The high prevalence of the patterns shared between domestic and wildlife could be enhanced by the nature of the ecosystems. In this area there are strong seasonal differences in the availability of food and water supplies which force animal aggregation at these resources. This transmission could also be favoured by the over-density of some species and lack of hunting.

This study in the Doñana National Park exposes the risk of introduction of domestic animals into wildlife areas when there is not a warranty of disease freedom, and there is a lack of appropriate diagnostic techniques and control measures. Unfortunately, this situation is not new and other examples can be found worldwide, not only about tuberculosis, i.e. transmission from cattle to buffalo (*Syncerus caffer*) and then to other species in the Kruger National Park (Michel et al., 2006), but also related to other infectious diseases, such as brucellosis in the Yellowstone National Park (Dobson and Meagher, 1996). We also highlight the effect of tuberculosis on species at risk of extinction such as the Iberian lynx. The high rate of infection in artiodactyla (mainly fallow deer) that are preyed on by lynxes may affect the survival of this wild felid in this area (Briones et al., 2000). Moreover, many of the infections shared between livestock and wildlife are zoonoses (Daszak et al., 2000; Kruse et al., 2004).

The essential decision now is to focus the efforts to slow the progress of the epidemic. Nowadays, culling is the only feasible option to control tuberculosis in wildlife, but this raises ethical questions balanced against economic considerations and wildlife conservation (Littin and Mellor, 2005; McCallum and Hocking, 2005); furthermore, results are unpredictable (Carter et al., 2007; Vicente et al., 2007).

## 5. Conclusion

Spoligotyping and MIRU-VNTR analysis provides further evidence of the transmission of *M. bovis* population between cattle and wildlife species

(artiodactyla and carnivores) sharing an ecosystem. This *M. bovis* population is persistent and undergoes micro-evolutionary steps over long period of time. The likelihood of inter-species pathogen transmission should be considered before introducing animals in areas that must be preserved from infectious diseases that have detrimental effects in both livestock and wildlife.

## Acknowledgments

This research was supported by projects AGL 2006-06206 of the Spanish Ministry of Science and Technology and TB-STEP 212414 of the European Union, and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. B. Romero is recipient of a research contract funded by Comunidad de Madrid (IV regional framework programme of research and technological innovation 2005–2008). We thank the guidelines and suggestions by partners of the EU coordination action “Veterinary European Network on Mycobacteria (VENoMYC)” during the WP7 workshop (Toledo, Spain, October 2006).

We are grateful to M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

## References

- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1951–1962.
- Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L., 2004a. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2602–2608.
- Aranaz, A., Romero, B., Montero, N., Álvarez, J., Bezos, J., de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., 2004b. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5388–5391.
- Bengis, R.G., Kock, R.A., Fischer, J., 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Rev. Sci. Technol.* 21, 53–65.
- Briones, V., de Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.I., Galka, M., Montero, N., Goyache, J., Aranaz, A., Domínguez, L., 2000. Bovine

- tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 189–191.
- Carter, S.P., Delahay, R.J., Smith, G.C., Macdonald, D.W., Riordan, P., Etherington, T.R., Pimley, E.R., Walker, N.J., Cheeseman, C.L., 2007. Culling-induced social perturbation in Eurasian badgers *Meles meles* and the management of TB in cattle: an analysis of a critical problem in applied ecology. *Proc. R. Soc. B* 274, 2769–2777.
- Corner, L.A., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 112, 303–312.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C., 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* 18, 127–134.
- Cousins, D.V., Skuce, R.A., Kazwala, R.R., van Embden, J.D., 1998. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union against tuberculosis and lung disease, tuberculosis in animals subsection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2, 471–478.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449.
- Dobson, A., Meagher, M., 1996. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. *Ecology* 77, 1026–1036.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.* 130, 415–421.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P.M., Sonnenberg, P., 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369, 1270–1276.
- Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W.A., 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144, 1189–1196.
- Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S., 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69, 203–217.
- García de Viedma, D., Marín, M., Ruiz Serrano, M.J., Alcalá, L., Bouza, E., 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J. Infect. Dis.* 187, 695–699.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914.
- Kruse, H., Kirkemo, A.M., Handeland, K., 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2067–2072.
- Littin, K.E., Mellor, D.J., 2005. Strategic animal welfare issues: ethical and animal welfare issues arising from the killing of wildlife for disease control and environmental reasons. *Rev. Sci. Technol.* 24, 767–782.
- Livingstone, P.G., 2000. Avances en materia de diagnóstico, control y erradicación de la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en animales domésticos y salvajes. In: 68th Sesión General del Comité Internacional, Office International del Epizooties, Paris, France, pp. 123–141.
- Martín-Hernando, M.P., Hoffe, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis (Edinb.)* 87, 360–367.
- McCallum, H., Hocking, B.A., 2005. Reflecting on ethical and legal issues in wildlife disease. *Bioethics* 19, 336–347.
- Michel, A.L., Bengis, R.G., Keet, D.F., Hofmeyr, M., Klerk, L.M., Cross, P.C., Jolles, A.E., Cooper, D., Whyte, I.J., Buss, P., Godfroid, J., 2006. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. *Vet. Microbiol.* 112, 91–100.
- Naranjo, V., Gortázar, C., Vicente, J., de la Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127, 1–9.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B., 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995–2000. *Prev. Vet. Med.* 54, 47–63.
- Parra, A., García, A., Inglis, N.F., Tato, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., Larrasa, J., 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Res. Vet. Sci.* 80, 140–146.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., Skuce, R., 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2126–2133.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, R.G., Neill, S.D., 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148, 519–528.
- Skuce, R.A., McDowell, S.W., Mallon, T.R., Luke, B., Breadon, E.L., Lagan, P.L., McCormick, C.M., McBride, S.H., Pollock, J.M., 2005. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet. Rec.* 157, 501–504.
- Smith, N.H., Dale, J., Inwald, J., Palmer, S., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Smith, J.M., 2003. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15271–15275.
- Supply, P., 2006. Protocol and Guidelines for Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *M. bovis* VENoMYC (Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases) WP7 Workshop, October 19–22 2006, Toledo, Spain, pp. 15–16.

- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C., 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36, 762–771.
- van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., Der Zeijst, B.A., Schouls, L.M., 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2393–2401.
- Vicente, J., Delahay, R.J., Walker, N.J., Cheeseman, C.L., 2007. Social organization and movement influence the incidence of bovine tuberculosis in an undisturbed high-density badger *Meles meles* population. *J. Anim. Ecol.* 76, 348–360.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Juste, R., Barral, M., Gortázar, C., 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet. Res.* 37, 107–119.
- Wilton, S., Cousins, D., 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1, 269–273.
- Winters, A., Driver, C., Macaraig, M., Clark, C., Munsiff, S.S., Pichardo, C., Jereb, J., LoBue, P., Lynch, M., 2005. Tuberculosis cases caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001–2004. *MMWR* 54, 605–608.





trols, are required to better define their pathogenic potential.

This work was supported by the Global Emerging Infections and Surveillance System, a Division of the Armed Forces Health Surveillance Center and in part by the National Institutes of Health under KL2 RR024994. The study protocol DODNAMRU3.2000.0002 (IRB Protocol No. 096) was hospital-based surveillance for enteric pathogens associated with severe diarrhea in Egyptian children.

**Salwa F. Ahmed,  
Peter J. Sebeny, John D. Klena,  
Guillermo Pimentel,  
Adel Mansour, Amel M. Naguib,  
Jody Bruton, Sylvia Y.N. Young,  
Lori R. Holtz, and David Wang**

Author affiliations: US Naval Medical Research Unit No. 3, Cairo, Egypt (S.F. Ahmed, P.J. Sebeny, J.D. Klena, G. Pimentel, A. Mansour, J. Bruton, S.Y.N. Young); Ministry of Health, Cairo (A.M. Naguib); and Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA (L.R. Holtz, D. Wang)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110909>

#### References

1. Klein EJ, Boster DR, Stapp JR, Wells JG, Qin X, Clausen CR, et al. Diarrhea etiology in a children's hospital emergency department: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2006;43:807–13. doi:10.1086/507335
2. Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinje J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *J Pediatr*. 2009;154:253–7. doi:10.1016/j.jpeds.2008.07.057
3. Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazed R, Savarino SJ, Wierzb TF, et al. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis*. 2000;182:685–90. doi:10.1086/315763
4. Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology*. 2008;5:117.
5. Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology*. 2009;6:161. doi:10.1186/1743-422X-6-161
6. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol*. 2009;83:10836–9. doi:10.1128/JVI.00998-09
7. Kapoor A, Li L, Victoria J, Odemide B, Mason C, Pandey P, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol*. 2009;90:2965–72. doi:10.1099/vir.0.014449-0
8. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:797–801.
9. Chu DK, Chin AW, Smith GJ, Chan KH, Guan Y, Peiris JS, et al. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol*. 2010;10:2457–62. doi:10.1099/vir.0.022764-0
10. Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenroder O, Mogel M, Poppe M, et al. A simple and rapid single-step m-RT-PCR to detect norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods*. 2004;118:49–59. doi:10.1016/j.jviromet.2004.01.016

Address for correspondence: Salwa F. Ahmed, US Naval Medical Research Unit No. 3 (NAMRU-3), PSC 452 Box 5000, FPO AE 09835, USA; email: [salwa.fouad.eg@med.navy.mil](mailto:salwa.fouad.eg@med.navy.mil)

## Humans as Source of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Cattle, Spain

**To the Editor:** *Mycobacterium tuberculosis* is the main causative agent of tuberculosis in humans. However, little attention has been paid to its transmission from humans to animals. We report *M. tuberculosis* infections in 3 cattle farms in Spain. The epidemiologic investigation traced humans as the source of infection, with 1 of the strains showing multidrug resistance.

Recent studies have reported isolation of *M. tuberculosis* in cattle with prevalences of 4.7%–30.8% in African and Asian countries (1–3). In cattle, this infection occurs in countries with the highest incidence of human tuberculosis in the world. In Europe, only 14 cases of *M. tuberculosis* infection have been described in 3 eastern countries since implementation of eradication programs (4,5). The only reported cases of *M. tuberculosis* in cattle in western Europe were described in Great Britain and date back to the 1950s (6).

During 2007–2009, three cases of tuberculosis caused by *M. tuberculosis* were detected in 3 unrelated cattle farms, 2 of them free of tuberculosis (farms 1 and 2). As part of the surveillance system of bovine tuberculosis, a pool of tissue samples from each cow (respiratory lymph nodes and lung) were homogenized with sterile distilled water, and culture was carried out by the BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system (Beckton Dickinson, Madrid, Spain). Members of the *M. tuberculosis* complex were identified and genotyped by direct variable repeat spacer oligonucleotide typing and mycobacterial interspersed repetitive unit–variable number tandem repeat (MIRU–VNTR) typing (7).

The 3 *M. tuberculosis*–infected animals were <9 months of age (Table). As described (6), the possibility of infection in young animals could be more probable than infection in older cows.

*M. tuberculosis*–infected animals from farms 1 and 3 were detected by the intradermal tuberculin test (Table). The animal without immunologic response (farm 2) was detected because an *M. bovis* infection was confirmed in the herd, and all animals were slaughtered. Confirmation of infection by culture without immunologic response is rare, although the high sensitivity of the mycobacteria growth indicator tube system could detect a low bacterial load in the initial stages

## LETTERS

of infection. Recent implementation of liquid systems in animal health laboratories has enabled detection of *M. tuberculosis* when it is compared with results using only conventional methods. Moreover, no tuberculosis-compatible lesions were observed in the 3 animals, similar to previous studies (6). On the basis of these facts, *M. tuberculosis* transmission was not detected among cattle in the following intradermal tuberculin tests.

Co-infection with other mycobacteria (*M. avium* subsp. *hominissuis*) was found in the same animal from farm 1 (Table). This co-infection suggested the immunocompromised status of the animal and hence a high susceptibility to *M. tuberculosis* infection. Moreover, *M. bovis* was isolated from 52% (16/31) of all animals from farm 2 that showed a positive reaction to the intradermal tuberculin skin test, making remarkable the absence of co-infection with *M. bovis* in the *M. tuberculosis*-infected animal. Therefore, the lack of *M. tuberculosis* transmission within this herd contrasts with the *M. bovis* dissemination.

The veterinary services reported these findings to the National

Public Health System, and an epidemiologic investigation was conducted on the cattle farms to determine the source of infection. In all cases, staff of the farms had active tuberculosis (Table). Three different strains were characterized: SIT2537 (octal code 77761777720771), 253533233433236252211423 (farm 1); SIT1564, 3'52334232455457251213423 (farm 2); and SIT58, 2543432432325262213423 (farm 3) (Table). The MIRU-VNTR pattern and spoligotype are shared by Spanish human and cattle isolates from farm 1; SIT2537 is an uncommon profile that has been detected in Brazil and Spain (according to the SITVIT2 database). The human strain showed multidrug resistance to isoniazid, rifampin, and ethionamide. In cattle and human isolates, genes associated with isoniazid and rifampin resistance were studied (8) and *rpoB* analysis confirmed rifampin resistance (Ser531Leu). In farm 2, the origin of the farm worker was eastern Europe and the cattle isolate showed an SIT1564 profile, which is found only in 6 human isolates in the SpolDB4 database, all from Poland, Bulgaria, and Russia. On farm

3, human and cattle isolates from Spain shared identical spoligotype and MIRU-VNTR patterns. The profile SIT58 is frequent in Spain (9) and other countries with historical links to Spain, mainly the south American countries (79/114 according to SpolDB4).

A well-designed program for eradicating bovine tuberculosis helps to detect *M. tuberculosis* infection by immune response or by bacteriologic culture. The use of liquid systems and results of epidemiologic studies (Spanish Database of Animal Mycobacteriosis, mycoDB.es) (S. Rodríguez, unpub. data) are recommended for prompt confirmation of the *M. tuberculosis* complex infection and for enhancing the sensitivity of culture. In addition, the Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine Affairs has reinforced the need to improve co-operation between human and animal health systems to minimize the risk for *M. tuberculosis* complex transmission from animals to humans or vice versa and to control infection in all susceptible animal species (10).

Table. Relevant information about *Mycobacterium tuberculosis* infection in 3 cattle farms in Spain\*

Variable	Farm 1	Farm 2	Farm 3
<b>Cattle herd</b>			
No. animals	6	54	>200
Production	Beef	Beef	Dairy
Previous status	TB free	TB-free	Non-TB free
No. reactors	1	31	12
<b><i>M. tuberculosis</i> infection in cattle</b>			
Year of isolation	2007	2008	2009
Age, mo	9	4	3
IDTB/interferon-γ	Pos/not determined	Neg/neg	Pos/not determined
TB-compatible lesion	No	No	No
Spoligotyping profile	SIT2537	SIT1564	SIT58
MIRU-VNTR profile†	253533233433236252211423	3'52334232455457251213423	2543432432325262213423
Co-infection with other mycobacteria	Yes ( <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> )‡	Yes ( <i>M. bovis</i> )	No
<b><i>M. tuberculosis</i> infection in human</b>			
Active tuberculosis	Yes	Yes	Yes
Spoligotyping profile	SIT2537	Not available	SIT58
MIRU-VNTR profile†	253533233433236252211423	3'52334232455457251213423	2543432432325262213423
Origin	Spain	Eastern Europe	Spain

\*TB, tuberculosis; IDTB, intradermal tuberculin tested according to the European Council Directive 64/432/EEC; pos, positive; neg, negative; MIRU-VNTR, mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat.

†MIRU-VNTR profile on the basis of the 24 MIRU-VNTR loci (7).

‡Co-infection in the same animal.

## Acknowledgments

We thank L. Carbajo, J. Carpintero, E. Fernández, and L.M. Álvarez for their continuous encouragement; F. Lozano, N. Moya, A. Gutiérrez, J. Gimeno, A. Penedo, A. Menéndez, C. Martínez, and J.A. Anguiano for technical help; R. Daza and M.S. Jiménez for providing the human strains and related data; Nalin Rastogi for comparison of spoligotyping results with the SITVIT2 proprietary database; and M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

This research was funded by project TB-STEP FP7-KBBE-2007-212414 of the European Union and by the Spanish Ministry of the Environment, and Rural and Marine Affairs and partially by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS S09/02205). B.R. received a research contract funded by Comunidad de Madrid (IV regional framework program of research and technological innovation 2005-2008).

**Beatriz Romero,  
Sabrina Rodríguez,  
Javier Bezos, Rosa Díaz,  
M. Francisca Copano,  
Isabel Merediz, Olga Mínguez,  
Sergio Marqués,  
Juan J. Palacios,  
Dario García de Viedma,  
José Luis Sáez, Ana Mateos,  
Alicia Aranaz,  
Lucas Domínguez,  
and Lucía de Juan**

Author affiliations: Universidad Complutense, Madrid, Spain (B. Romero, S. Rodríguez, J. Bezos, A. Mateos, A. Aranaz, L. Domínguez, L. de Juan); Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio, Madrid (R. Díaz); Laboratorio de Sanidad Animal de Jove, Gijón, Spain (M.F. Copano, I. Merediz); Consejería de Agricultura y Ganadería, Valladolid, Spain (O. Mínguez, S. Marqués); Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain (J.J. Palacios); Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, and Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias Enfermedades Respiratorias, Madrid (D. García de Viedma); and Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid (J.L. Sáez)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.101476>

## References

1. Fetene T, Kebede N, Alem G. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of western Gojam, Ethiopia. *Zoonoses Public Health*. 2011;58:47–53. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01265.x
2. Chen Y, Chao Y, Deng Q, Liu T, Xiang J, Chen J, et al. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89:95–100. doi:10.1016/j.tube.2008.07.003
3. Prasad HK, Singhal A, Mishra A, Shah NP, Katoch VM, Thakral SS, et al. Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005;85:421–8. doi:10.1016/j.tube.2005.08.005
4. Pavlik I, Trcka I, Parmova I, Svobodova J, Melicharek I, Nagy G, et al. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six central European countries during the years 2000–2004. *Vet Med Czech*. 2005;50:291–9 [cited 2011 Oct 24]. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/50-7-291.pdf>
5. Pavlik I, Ayele WY, Parmova I, Melicharek I, Hanzlikova M, Körmendy B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* in animal and human population in six Central European countries during 1990–1999. *Vet Med Czech*. 2003;48:83–89 [cited 2011 Oct 24]. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/48-4-83.pdf>
6. Lesslie IW. Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus. *Vet Rec*. 1960;72:218–24.
7. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4498–510. doi:10.1128/JCM.01392-06
8. Romero B, Aranaz A, de Juan L, Álvarez J, Bezos J, Mateos A, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3405–8. doi:10.1128/JCM.00730-06
9. García de Viedma D, Bouza E, Rastogi N, Sola C. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1797–806. doi:10.1128/JCM.43.4.1797-1806.2005
10. Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino. Discussion conference about the eradication of bovine tuberculosis [in Spanish]. Santander, 2010 Jun 29–30, Spain [cited 2011 Oct 24]. [http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/eventos\\_presidencia/jornada\\_tuberculosis\\_bovina.htm](http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/eventos_presidencia/jornada_tuberculosis_bovina.htm)

Address for correspondence: Lucía de Juan, VISAVET Health Surveillance Centre and Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; email: [dejuan@visavet.ucm.es](mailto:dejuan@visavet.ucm.es)

## Porcine and Human Community Reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark

**To the Editor:** *Enterococcus faecalis*, which exists commensally in the gut in warm-blooded animals and humans, is an opportunistic pathogen that causes a variety of community-acquired and health care-associated infections, such as urinary tract and intraabdominal infections, bacteremia, and endocarditis (1). Only a few studies have assessed the relationships between clinical *E. faecalis* strains; strains endemic to the health care setting; and community strains residing in humans, animals, or animal-origin food (2).

Recently we showed that the emergence of high-level gentamicin-resistant (HLGR) *E. faecalis* among patients with infective endocarditis (IE) coincided with an increase in HLGR *E. faecalis* in the pig population in Denmark (3). The majority of isolates belonged to the same clonal group (sequence type [ST] 16), suggesting that pigs constitute a community reservoir of HLGR *E. faecalis*.





## **CAPÍTULO II**

DISEÑO Y APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR COMO HERRAMIENTA  
EPIDEMIOLÓGICA EN AISLADOS DEL  
COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*  
DE ORIGEN ANIMAL Y HUMANO



## RESUMEN

El uso de las técnicas de caracterización molecular ha contribuido notoriamente en los estudios epidemiológicos de la tuberculosis bovina, causada por cualquiera de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y el establecimiento del origen de la infección. En general se ha llegado a un consenso sobre cuáles son las técnicas de más utilidad para la tipificación de los aislados del complejo *M. tuberculosis* y, principalmente para *M. bovis*: el espoligotipado y el análisis de los marcadores MIRU-VNTR. Ambas técnicas han sido adoptadas en la mayoría de los laboratorios porque son rápidas, sencillas, y económicas, ya que están basadas en la PCR. Además presentan la ventaja añadida de generar resultados cualitativos que pueden ser comparados entre los distintos estudios realizados a nivel nacional e internacional. El grado de diferenciación y reproducibilidad de ambas técnicas es bueno aunque el espoligotipado ofrece una menor discriminación que los marcadores MIRU-VNTR en algunas ocasiones.

La aplicación de estas técnicas de caracterización molecular fue la base para el primer trabajo en el que realizamos un análisis molecular de varias cepas isogénicas obtenidas mediante subcultivo en el laboratorio a partir de un aislado de *Mycobacterium tuberculosis* procedente de un perro infectado. Las técnicas empleadas fueron el espoligotipado, el análisis de los marcadores MIRU-VNTR y la secuenciación de un fragmento del locus DR. Durante un periodo de cinco años (1998-2003) el aislado de *M. tuberculosis* fue subcultivado para preservar su viabilidad. El subcultivo siempre se realizó a partir del cultivo anterior, habiéndose realizado siete pases durante cinco años (subcultivos nombrados de la A a la H, siendo A el aislado clínico y H el último subcultivo). Mediante la técnica de espoligotipado se observó un cambio en el perfil de los 2 últimos subcultivos (G y H) con respecto a los seis previos (A a la F), habiendo perdido el espaciador 2 (posición en la membrana comercial).

La delección este espaciador y de su región DR adyacente se comprobó mediante la secuenciación de un fragmento amplificado entre los espaciadores 1 y 4. La visualización del fragmento amplificado de cada subcultivo en un gel de agarosa mostró dos bandas de distinto tamaño dependiendo del subcultivo: para el aislado clínico (A) y el primer subcultivo (B), 259 pares de bases; para los dos últimos subcultivos (G y H), 187 pares de bases; y para los 4 subcultivos intermedios (C, D, E y F), una doble banda con ambos tamaños de banda. Estos resultados indican la presencia y la coexistencia de dos poblaciones en el mismo tiempo, dato imposible de detectar mediante el espoligotipado debido a que la superposición de ambos perfiles siempre dio lugar a la presencia del espaciador 2. El análisis del aislado clínico (A) y del último subcultivo (H) mediante 14 marcadores MIRU-VNTR no mostró variaciones a este nivel. Por lo tanto, este estudio corrobora la hipótesis de la pérdida de DVRs únicos o múltiples como mecanismo de variación entre las cepas y destaca la posibilidad de clasificar aislados relacionados como si no fuesen así. Por ello resalta que la información derivada de las técnicas moleculares siempre debe ser integrada con aquella obtenida mediante la epidemiología clásica y el estudio de contactos.

*Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en el ganado bovino y en otras especies animales, y su implicación como agente causal de tuberculosis en humanos ha sido reconocida desde principios del siglo XX. En líneas generales en los países industrializados, la prevalencia de la infección humana por *M. bovis* es inferior al 1% y ha sido controlada mediante la pasteurización de la leche de vaca, la inspección en los mataderos y el sacrificio de los animales reactivos a la prueba obligatoria de la tuberculina. En los países menos desarrollados se estima que los casos de tuberculosis en humanos producidos por *M. bovis* oscila entre el 10-15%, aunque la ausencia de métodos de identificación del agente patógeno impide conocer con precisión estos datos. Debido a que *M. bovis* afecta principalmente al ganado bovino es lógico establecer a los animales o sus productos derivados como fuente de infección para los humanos. En este mismo contexto, en el segundo trabajo de este capítulo se describe un estudio de epidemiología molecular de cinco aislados de *M. bovis* de procedencia humana y animal que presentaban el mismo espoligotipo. La peculiaridad de los aislados humanos era su carácter multirresistente (resistencia a 11 antibióticos antituberculosos) y la elevada mortalidad que produjo en un brote acontecido en los años 90 en un hospital de Madrid, y que posteriormente se difundió a otras regiones españolas y diversas zonas europeas y estadounidenses. El origen de esta infección no se identificó y durante el análisis de los perfiles de espoligo recogidos en la base de datos del laboratorio de Micobacterias se halló una cepa aislada de tres vacas de una misma explotación con el mismo espoligotipo que la cepa que produjo el brote en el hombre, siendo este espoligotipo un perfil muy poco frecuente. La aplicación de los marcadores MIRU-VNTR como método más discriminativo que el espoligotipado mostró la existencia de un patrón distinto entre los aislados humanos y animales, presentando los aislados humanos una copia menos en dos marcadores (VNTR 3232 y VNTR 2165) de los nueve *loci* estudiados. Para corroborar las diferencias entre los aislados animales y humanos también se estudió la presencia/ausencia de otros espaciadores no presentes en la membrana comercial, ya que ésta fue diseñada en su origen para la discriminación de *M. tuberculosis*. Para ello se diseñó una PCR dirigida a la región que comprende los espaciadores 1 al 15 de la membrana comercial. Los resultados obtenidos de ese fragmento mediante

secuenciación mostraron la ausencia de cuatro espaciadores en los aislados bovinos en relación a los humanos (posición 6, 7, 8, 11, según el orden genómico). Según estos resultados concluimos que ambos grupos de aislados eran cepas distintas, y que el origen del brote de *M. bovis* multirresistente en humanos queda pendiente de identificar. También se especula sobre el uso de la isoniazida como promotor del crecimiento en el ganado bovino en los años 50. Este hecho pudo generar resistencia a este antibiótico en las cepas animales y transmitirse al hombre. Un diagnóstico inadecuado de la cepa en humanos, unido a la resistencia innata de *M. bovis* a la pirazinamida, pudo favorecer la adquisición del resto de resistencias.

La discriminación que ofrecen de las técnicas de caracterización molecular es el reflejo de la capacidad de diferenciación que tiene una técnica para una selección de los aislados determinada. Con el objetivo de mejorar la discriminación del espoligotipado, en el tercer estudio evaluamos una membrana preparada con 25 nuevos espaciadores en comparación con la membrana tradicional. En este estudio se incluyeron aislados de *M. bovis* (N=308), incluidos en 26 espoligotipos, y *M. caprae* (N=88), agrupados en cinco espoligotipos. Todos los aislados eran de origen animal, tanto domésticos (vacas y cabras) como salvajes (ciervos y jabalíes). Los resultados obtenidos con los nuevos espaciadores agruparon a los aislados de *M. bovis* en 17 perfiles y a los aislados de *M. caprae* en 2 perfiles. Al combinar ambas membranas se observó un aumento de 31 a 45 espoligotipos, aunque este aumento únicamente se dio en *M. bovis* (de 26 a 40 espoligotipos). El uso de los nuevos espaciadores diferenció los aislados incluidos en ocho de los 16 espoligotipos iniciales que presentaban más de un aislado; el espoligotipo más prevalente en España, SB0121, fue subdividido en ocho subtipos, y los siete perfiles restantes en 2 subtipos cada uno. Tanto la membrana comercial como la diseñada en este estudio diferenciaron las especies *M. bovis* y *M. caprae*. Por otra parte, el análisis de los 68 espaciadores (43 de la membrana comercial y 25 de la nueva membrana) mostró que sólo 13 de ellos (1, 2, 6, 13, 15, 17, 21, 28, 37, 52–54 y 57) generaron 29 espoligotipos. Además, un total de 39 espaciadores (1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 23, 26–32, 37, 44–49, 51–54, 56 y 57) ofrecieron la mayor discriminación para *M. bovis* y *M. caprae* y 35 espaciadores (1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 26–32, 37, 44–48, 52–54 y 57) la mayor discriminación para *M. bovis*. Por lo tanto, concluimos que la búsqueda de nuevos espaciadores y el diseño de una membrana pueden ser útiles para la realización de estudios epidemiológicos en aislados de *M. bovis* y *M. caprae*.

La capacidad de discriminación de las distintas técnicas de caracterización molecular también ha sido evaluada en un cuarto estudio mediante el espoligotipado (usando la membrana comercial), el espoligotipado de segunda generación (usando una membrana con 25 espaciadores adicionales no incluidos en la comercial) y el análisis de ocho *loci* MIRU-VNTR. Sobre un panel de 45 cepas de *M. bovis* (N=40) y *M. caprae* (N=5) no relacionadas epidemiológicamente se aplicaron las tres técnicas: la discriminación del espoligotipado con membrana comercial con 43 espaciadores fue de 0,9869 (36 perfiles); la de la membrana de segunda generación con 25 espaciadores fue de 0,7828 (14 perfiles); y la de los ocho *loci* MIRU-VNTR fue de 0,9889 (35 perfiles). La combinación de todos los espaciadores del locus DR incluidos en este estudio dio lugar a 37 perfiles distintos, y la combinación adicional con MIRU-VNTR generó un total de 44 perfiles. Analizando las técnicas de

forma individual se observó que, en términos generales, los espaciadores seleccionados para la membrana de segunda generación no aportaron más variabilidad entre las cepas del estudio y que tanto el espoligotipo como el análisis con MIRU-VNTR generaban perfiles únicos para 27 cepas. La inclusión de varios perfiles de espoligo en un mismo patrón MIRU-VNTR llevó al estudio de los mismos, hallando en un caso una asociación entre dos cepas consideradas no relacionadas, al estar asociados al mismo municipio y presentar una de ellas una delección de varios DVRs consecutivos. Además la diferenciación de las cepas incluidas en dos de los perfiles más prevalentes en España (SB0121 y SB0256) mediante MIRU-VNTR corrobora los resultados obtenidos por otros autores. Por lo tanto, destacamos que en el caso de cepas no relacionadas el análisis de los resultados obtenidos mediante el espoligotipado y la técnica MIRU-VNTR puede aportar información adicional y que es recomendable el uso de MIRU-VNTR en aquellos espoligotipos más frecuentes en un área determinada (manuscrito en preparación).

## Spoligotyping Profile Change Caused by Deletion of a Direct Variable Repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* Isogenic Laboratory Strain

Alicia Aranaz,\* Beatriz Romero, Natalia Montero, Julio Álvarez, Javier Bezos, Lucía de Juan, Ana Mateos, and Lucas Domínguez

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Received 23 February 2004/Returned for modification 16 April 2004/Accepted 23 June 2004

**Spoligotyping is a major tool for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. For epidemiological purposes, strains are considered clonal only when their spoligotyping patterns are identical. We report a change in the spoligotyping profiles of truly isogenic strains (a clinical isolate and a subculture derived in the laboratory) caused by deletion of a direct variable repeat. Without the information about the relationship between them, a link between these strains would have gone unnoticed. Evolutionary events should be taken into account in the interpretation of spoligotyping results and in the design of databases.**

The direct variable repeat (DVR) spacer oligonucleotide typing technique (spoligotyping) (17) detects DNA polymorphism within the direct repeat (DR) locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. The DR locus contains multiple DVRs that consist of well-conserved 36-bp DRs interspersed with spacer sequences (spacers) 34 to 41 bp long (14). The order of the DVRs is strongly conserved in the various isolates (29). Polymorphism in this region appears to comprise mainly the presence or absence of single, discrete DVRs or stretches of contiguous DVRs (13, 29). Differentiation of strains is based on the presence or absence of the spacers in a hybridization pattern (spoligotype), and this has been exploited for the study of the epidemiology of tuberculosis. Although its level of discrimination is much lower than that obtained with the restriction fragment length polymorphism associated with IS6110 in most strains (strains carrying five or more IS6110 copies), the performance of the technique regarding the degree of differentiation and reproducibility is good (17, 18). Furthermore, the polymorphism obtained by spoligotyping of the IS6110 low-copy-number *M. tuberculosis* complex isolates proved to be superior to the polymorphism obtained by IS6110-associated restriction fragment length polymorphism (2, 10, 11, 18, 34).

This technique has gained widespread acceptance because it is a simple, rapid, and robust method. Results can be expressed in a simple digital format and are easier to compare and store in comparison with those of other available techniques. Thus, it has been extensively applied, alone or in conjunction with other techniques, for tracking epidemics (1, 4, 12, 16, 20, 26, 27, 34); for the description of highly prevalent families such as the Beijing family (30), multidrug-resistant strain W-Beijing (3), and Western Cape F11 (32); and to study global epidemiology (8). A search in June 2004 of the PubMed website of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) retrieved 186 papers on this topic since 1996. Furthermore, it has allowed the construc-

tion of databases with spoligotypes collected worldwide for the comparison of large numbers of strains with simple software, i.e., the database at <http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb3.htm>, Institut Pasteur, Guadeloupe (8), and the specific database on its close relative *M. bovis* at <http://www.Mbovis.org>, hosted by the University of Sussex, Falmer, United Kingdom.

Three types of mechanisms have been hypothesized to be responsible for *M. tuberculosis* complex strain DR polymorphism: homologous recombination between DRs, rearrangements driven by the insertion element IS6110, which is present in the DR region of most *M. tuberculosis* complex strains (13), and successive deletion of a single DVR or multiple discrete DVRs from an archetypal DR region (29).

We report a change in the spoligotyping profile of *M. tuberculosis* isogenic strains (a clinical isolate and a subculture) obtained in the laboratory. This change was caused by the deletion of a single spacer and the adjacent DR.

***M. tuberculosis* strains.** An *M. tuberculosis* complex isolate (98/426) was cultured from the mediastinal lymph node collected at the post mortem examination of a dog with respiratory distress that did not respond to conventional treatments (31). Granulomatous lesions from the lymph node were homogenized with sterile distilled water and decontaminated with 0.35% hexadecylpyridinium chloride for 30 min (5), centrifuged at  $1,068 \times g$  for 30 min, and cultured onto Coletsos and 0.2% (wt/vol) pyruvate-enriched Löwenstein-Jensen media (bioMérieux España and Biomedics, Madrid, Spain). Tubes were incubated at 37°C and checked for growth weekly. The isolate was identified as *M. tuberculosis* by staining for acid-alcohol fastness, colony morphology, and PCR amplification of the *Mycobacterium* genus-specific 16S rRNA fragment and MPB70 sequence (35).

Isolate 98/426 was subcultured on Coletsos (Biomedics) from 1998 to 2003 as a part of the culture collection kept in our laboratory. The original isolate, designated isolate a, was subcultured, resulting in the first subculture, designated subculture b. Subsequently, subculture b was subcultured and the same procedure was repeated periodically during the aforementioned period of time. Bacterial growth was recovered from the tubes (although cells were not recovered from every subculture), suspended in

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M. Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 3944083. Fax: 34 91 3943908. E-mail: [alaranaz@vet.ucm.es](mailto:alaranaz@vet.ucm.es).





FIG. 1. Spoligotyping pattern of original strain 98/426 (a) and the pattern that resulted from batch g, showing the difference in the results obtained for spacer 2.

sterile purified water, heat inactivated, and kept frozen at  $-25^{\circ}\text{C}$  for use as the *M. tuberculosis* control in routine molecular tests. A series of DNAs was therefore available in chronological order, designated a (clinical isolate, 6/1998), b (first subculture, 6/1999), c (a subculture from 2/2000), d (9/2000), e (1/2001), f (4/2001), g (1/2002), and h (1/2003, last subculture).

**Spoligotyping.** PCR amplification and hybridization were performed as described by Kamerbeek et al. (17), with only minor changes to obtain good hybridization patterns under our laboratory conditions. Amplification of the DR locus was performed with heat-treated cell suspensions. Crude supernatants of *M. tuberculosis* 98/426 and a clinical isolate of *M. bovis* and purified sterile water were included as controls in every batch of tests. The test was carried out with membranes obtained from Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands.

A change (1 to 0) in spacer 2 in the traditional spoligotyping result (genome spacer 3 according to the numbering system of van Embden et al. [29]) was observed in batches g and h (Fig. 1) in comparison with results that had been obtained with batches a to f. The rest of the spacers remained unchanged. During this period of time, several membranes had been used; therefore, these results were corroborated in the same membrane.

**Detection of the DVR deletion.** To study the reason for this change in the spoligotyping profile, the following primers targeting adjacent spacers were designed to amplify a fragment of the 5' region of the DR locus: sp1 (forward) (5' AAC CAT AGA GGG TCG CCG 3') and sp4 (reverse) (5' GAT GAT TGG TCG GCG TAT 3'), which are based on the known sequences of spacers 1 and 4, respectively. DNA amplifications were performed in 25- $\mu\text{l}$  reaction volumes containing 2.5  $\mu\text{l}$  of 10 $\times$  standard reaction buffer including 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (Biotools, B&M Labs), 200 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP mix; Biotools), 0.5 U of DNA polymerase (Biotools), and 50 ng of each oligonucleotide primer (Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics). Amplification was performed with 35 cycles of 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 2 min at  $65^{\circ}\text{C}$ , and 3 min at  $72^{\circ}\text{C}$ ; the initial denaturation and final extension steps were extended for 10 min. Sterile water was included as a negative control. Amplification products were checked on a 2% agarose gel and examined under UV light after staining with ethidium bromide. The amplification products obtained with original isolate a (1998) and DNA batch h (2003) were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and sequenced with the DyeDeoxy (dRhodamine) Terminator cycle sequencing kit in an automatic ABI Prism 373 DNA sequencer (Applied Biosystems) (CIB Sequencing Facilities, Madrid, Spain).

When DNA was amplified by PCR with primers sp1 and sp4, a product of the expected 259 bp was observed in original isolate a and subculture b; two products (a 259-bp product and a smaller fragment) were detected in DNA batches c to f, while batches g and h yielded only the smaller PCR product (Fig. 2).

The sequences from the amplification products of subcultures a and h, 259 and 187 nucleotides, respectively, were aligned with the *M. tuberculosis* DR cluster DNA (accession no. Z48304; Kamerbeek et al. [17]) from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Sequence analysis showed a deletion of spacer 2 and an adjacent DR, but from the sequencing data it cannot be deduced whether the previous or the subsequent one was lost (Fig. 3).

We suppose that the deletion event happened in a single cell that subsequently multiplied successfully. Both populations coexisted during a period of time, and the spoligotyping pattern detected in the X-ray film is in the superimposed images of both profiles, with spacer 2. Finally, only the spoligotyping profile from the deleted strain can be detected. We cannot explain the mechanism causing the mutated population to overgrow the parental strain. It is tempting to speculate that the deletion gave the strain a growth advantage. The DVR belongs to the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) family of sequences that are widely distributed among prokaryotic species (15, 22). A comparison of genes that flank the CRISPR loci has shown homology among four genes designated CRISPR-associated genes (*cas*); two of them, *cas1* and *cas2*, have been found in the *M. tuberculosis* complex (15). However, except for their involvement in replicon partitioning in the archaeon *Haloflex mediterranei* (21), it is unclear whether the CRISPR loci and *cas* genes have a biological function (15, 22). Because the purpose of the subsequent subculturing was to obtain a large amount of mycobacterial cells, it was performed by loading the loops generously before inoculating the new medium, but we cannot dismiss the possibility of random selection of a single colony of the mutated strain.

Contamination of the cultures was ruled out, as great precautions were always taken when subculturing this *M. tuberculosis* strain. The few other *M. tuberculosis* strains that we have isolated in our laboratory have different spoligotypes (data not shown). The original isolate, a, and the last DNA batch, h,

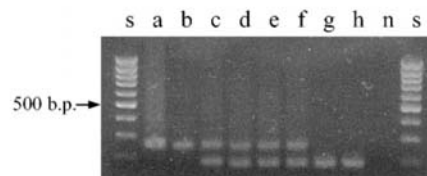


FIG. 2. PCR amplification of DNA batches a to h of *M. tuberculosis* strain 98/426 with primers sp1 (forward) and sp4 (reverse). Lanes s, 100-bp ladder (Biotools, B&M Labs) used as a DNA molecular size marker; lane n, negative control. The 259-bp band indicates the presence of the original sequence of the DR; the 187-bp band corresponds to the sequence without DVR 2 (deleted).



FIG. 3. Alignment of the sequences of a fragment of the 5' region of the DR locus. The first nucleotide corresponds to position 872 (accession no. Z48304). Annealing sites for the primers are underlined, and the DRs are shaded. Dashes indicate deletions. The true positions of the DR and the adjacent T (in italics) from subculture h cannot be deduced from the sequencing data (bases 916 to 951 and 952 and bases 988 to 1023 and 1024, respectively).

were also studied by mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU)-variable-number tandem repeat (VNTR) analysis aimed at loci QUB11a (positions 2163333 to 2163531), QUB26 (positions 4052968 to 4053547) (25), ETR-A (positions 2165204 to 2165611), ETR-B (positions 2461280 to 2461550) (9), 4, 26, 40, 10, 16, 31, 2, 23, 39, and 27 (28), which showed identical profiles for these 14 loci (Fig. 4 and 5).

Spoligotyping has rapidly become an accepted standard technique for molecular epidemiology of *M. tuberculosis* complex infections. DR spacer markers are stable enough for spoligotyping to be used as a tool for molecular epidemiology; thus, for epidemiological purposes, strains are considered clonal only when their spoligotyping profiles are identical. Little is known about the microevolutionary events associated with the DR locus and their influence on the interpretation of spoligotyping. The pace of the "molecular clock" associated with this genetic marker seems to be extremely slow, as multiple *M. tuberculosis* isolates from the same patients corresponding to relapses or infections at different sites showed identical spoligotypes (6, 10, 11, 23, 26).

Some recent studies have focused on the processes involved in the genetic changes that may produce polymorphism in the DR region by comparison of *M. tuberculosis* strains that have some features in common or isolates from a strain family, although they are not strictly isogenic. Occasional insertion element-driven polymorphisms have been described: IS6110-mediated deletion in the DR region lead-

ing to the loss of large blocks of DVRs adjacently situated (24), insertion of IS6110 into the DR sequence that results in asymmetrical disruption that does not serve as a PCR target (19, 24, 29, 33), and insertion of IS6110 into the spacer sequence that prevents hybridization (33). Loss of an intact, discrete DVR or a set of contiguous DVRs has also been described in presumably isogenic pairs of strains or related strains (7, 26, 29, 33).

To our knowledge, this is the first report of a change in the DR region in truly isogenic strains (subculture derived in the laboratory). This change has been caused by deletion of a DVR, yielding a different spoligotyping pattern. Our observation corroborates the hypotheses suggested by Van Embden et al. (29) of deletion of a single DVR or multiple discrete DVRs as a mechanism underlying *M. tuberculosis* strain-to-strain variation.

These two strains would not have been grouped together in the same cluster under the current criteria for interpretation of spoligotyping data. This means that a link between these isogenic strains would have gone unnoticed. It is likely that these deletion

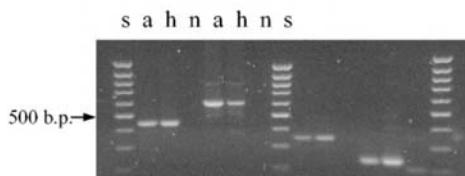


FIG. 4. MIRU-VNTR analysis of batches a and h of *M. tuberculosis* strain 98/426 with the primers described by Skuce et al. (25). Amplification products were checked on a 2.5% agarose gel, run for 120 min at 45 V, and examined under UV light after staining with ethidium bromide. From left to right, loci QUB-11a, QUB-26, ETR-A, and ETR-B are shown. Lanes s, 100-bp ladder (Biotools, B&M Labs) used as a DNA molecular size marker; lane n, negative control.

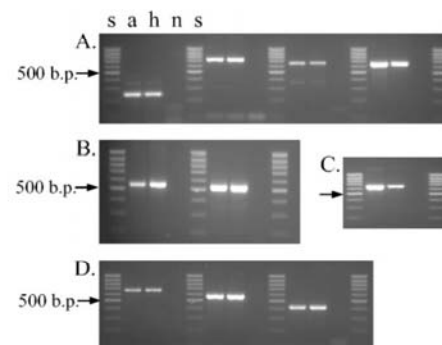


FIG. 5. MIRU-VNTR analysis of batches a and h of *M. tuberculosis* strain 98/426 with the primers described by Supply et al. (28). Amplification products were checked on a 2.5% agarose gel, run for 90 min at 45 V, and examined under UV light after staining with ethidium bromide. Panels: A, loci 4, 16, 10, and 31 (left to right); B, loci 26 and 40; C, locus 39; D, loci 2, 23, and 27. Lanes s, 100-bp ladder (Biotools, B&M Labs) used as a DNA molecular size marker; lane n, negative control.

events also happen in vivo, although different molecular clocks may exist. Bringing our observation into the perspective of epidemiology highlights two aspects: (i) the information derived from spoligotyping must always be integrated with detailed and precise information such as that provided by classical epidemiology and contact tracing and (ii) the need to take into account the evolutionary events in the DR region for the interpretation of spoligotyping results and for the design of databases.

A. Aranaz is the recipient of a fellowship from the Ramon y Cajal Program (Spanish Ministry of Science and Technology). This work was supported by project AGL 2001-2029 of the Spanish Ministry of Science and Technology and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA).

We thank the staff of the SADNA (CIB, Madrid, Spain) for sequencing. We are grateful to Matthew Guilmour for careful revision of the manuscript.

## REFERENCES

- Banu, S., S. V. Gordon, S. Palmer, R. Islam, S. Ahmed, K. M. Alam, S. T. Cole, and R. Brosch. 2004. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain. *J. Clin. Microbiol.* 42:674-682.
- Bauer, J. A., B. Andersen, K. Kremer, and H. Möhrner. 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 37:2602-2606.
- Bifani, P. J., B. Mathema, Z. Liu, S. L. Moghazeh, B. Shopsis, B. Tempalski, J. Driscoll, R. Frothingham, J. M. Musser, P. Alcabes, and B. N. Kreiswirth. 1999. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 282:2321-2327.
- Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodríguez, I. García, P. Cabrera, C. Lloz, S. Samper, H. Takif, O. Alfonso, J. M. Pavón, M. J. Torres, D. van Soolingen, D. A. Enarson, and C. Martín. 2001. Epidemiological evidence of the Beijing genotype on Gran Canaria island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1165-1170.
- Corner, L. A., and A. G. Trajstman. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* 18:127-134.
- Driscoll, J. R., M. A. McGarry, and H. W. Taber. 1999. DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 37:274-275.
- Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K. J. Forbes. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol.* 180:2102-2109.
- Filioli, L., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valétude, D. D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, H. M. Ly, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Möström, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolof-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rosetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takif, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, and N. Rastogi. 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J. Clin. Microbiol.* 41:1963-1970.
- Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem repeats. *Microbiology* 144:1189-1196.
- Goguet de la Salmonière, Y. O., H. L. Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. van Embden, and B. Gicquel. 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 35:2210-2214.
- Goyal, M., N. A. Saunders, J. D. A. van Embden, D. B. Young, and R. J. Shaw. 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 35:647-651.
- Goyal, M., S. Lawn, B. Afifi, J. W. Acheampong, G. Griffin, and R. Shaw. 1999. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J. Infect.* 38:171-175.
- Groenen, P. M. A., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, and J. D. A. van Embden. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: applications for strain differentiation by a novel method. *Mol. Microbiol.* 10:1057-1065.
- Hermans, P. W. M., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. W. de Haas, J. W. Dale, and J. D. A. van Embden. 1991. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59:2695-2705.
- Jansen, R., J. D. A. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575.
- Källenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S. E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B. Marklund, and S. B. Svensson. 1999. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* 37:3872-3878.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. D. A. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
- Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. M. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakus, J. M. Musser, and J. D. A. van Embden. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:2607-2618.
- Legrand, E., I. Filioli, C. Sola, and N. Rastogi. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39:1595-1599.
- Martínez, J. L., F. S. Chaves, A. A. Arce, M. S. Alonso, E. M. Palenque, F. H. Jaen, M. M. Teresa, M. G. Gor, and A. N. Rodríguez. 2000. Recent transmission of tuberculosis in Madrid (Spain): usefulness of molecular techniques. *Med. Clin.* 115:241-245.
- Mojica, F. J., C. Ferrer, G. Juez, and F. Rodríguez-Valera. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloflex mediterranei* and *Haloflex volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* 17:85-93.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villaseñor, E. Soria, and G. Juez. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genome of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36:244-246.
- Niemann, S., E. Richter, and S. Rusch-Gerdes. 1999. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 37:409-412.
- Sampson, S. L., R. M. Warren, M. Richardson, T. C. Victor, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, and P. D. van Helden. 2003. IS6110-mediated deletion polymorphism in the direct repeat region of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 185:2856-2866.
- Skuce, R., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. G. Hewinson, and S. D. Neill. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148:519-528.
- Soini, H., X. Pan, A. Amin, E. A. Graviss, A. Siddiqui, and J. M. Musser. 2000. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38:669-676.
- Sola, C., A. Devallois, L. Horgen, J. Maisetti, I. Filioli, E. Legrand, and N. Rastogi. 1999. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 5:404-414.
- Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 39:3563-3571.
- van Embden, J. D. A., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. M. van der Zeijst, and L. M. Schouls. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182:2393-2401.
- van Soolingen, D., L. Qian, P. E. W. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portals, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. A. van Embden. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.* 33:3234-3238.
- Vela, A. L., I. Simarro, L. de Juan, A. Aranaz, N. Montero, A. Mateos, G. Suárez, L. Domínguez, R. de los Ríos, R. Martín, S. Moreno-Alcalde, A. García-Nieto, C. Martín-Scapa, E. Navas-Elorza, E. Gómez-Mampaso, and N. Gamarra. 2001. A propósito de un caso de tuberculosis canina. *Prof. Vet.* 49:48-53.
- Victor, T. C., P. E. de Haas, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. van Soolingen, P. D. van Helden, and R. Warren. 2004. Molecular characteristics and global spread of *Mycobacterium tuberculosis* with a Western Cape F11 genotype. *J. Clin. Microbiol.* 42:769-772.
- Warren, R. M., E. M. Streicher, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M. A. Behr, T. C. Victor, and P. D. van Helden. 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J. Clin. Microbiol.* 40:4457-4465.
- Wilson, S. M., S. Gross, and F. Drobniewski. 1998. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J. Clin. Microbiol.* 36:3385-3388.
- Wilton, S., and D. Cousins. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1:209-273.

## Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Isolates with the Same Spoligotyping Profile as Isolates from Animals†

Beatriz Romero,<sup>1</sup> Alicia Aranaz,<sup>1\*</sup> Lucía de Juan,<sup>1</sup> Julio Álvarez,<sup>1</sup> Javier Bezos,<sup>1</sup> Ana Mateos,<sup>1</sup> Enrique Gómez-Mampaso,<sup>2</sup> and Lucas Domínguez<sup>1</sup>

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,<sup>1</sup> and Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, 28034 Madrid, Spain<sup>2</sup>

Received 6 April 2006/Returned for modification 8 May 2006/Accepted 6 July 2006

PCR-based characterization techniques have been adopted in most laboratories for *Mycobacterium bovis* typing. We report a molecular characterization of human multidrug-resistant *M. bovis* isolates and three bovine isolates that share the spoligotyping profile. The analysis of the direct repeat region showed that both groups differed in the presence of spacers not included in the current membrane. They were also distinguished by two out of the nine mycobacterial interspersed repetitive unit variable-number tandem repeat loci tested, indicating that the human infection was not acquired from the cattle from which isolates were obtained. These results highlight that a combination of techniques is required for appropriate discrimination, even for those spoligotypes that have a low frequency.

*Mycobacterium bovis* causes tuberculosis in cattle and other animals, and its implication in human tuberculosis has been recognized since the beginning of the twentieth century (21). In industrialized countries, human infection with *M. bovis* has been largely controlled through pasteurization of cow's milk, abattoir inspection, and culling of cattle reacting to compulsory diagnosis (tuberculin test). In spite of this, several cases of human tuberculosis caused by *M. bovis* have been described in recent years (6–8, 12, 17, 20), although some human *M. bovis* infections could be attributed to a possible endogenous reactivation of a historically acquired infection (11). On the other hand, some new cases of human *M. bovis* tuberculosis have also been associated with the consumption of dairy products, for instance, unpasteurized cheeses on the United States-Mexico border (7, 17, 35). Thereby, cases of human *M. bovis* have been related to immigrants or to people who have contracted the infection in countries where eradication programs are patchy or nonexistent (35). Moreover, several of these studies also found an association between human *M. bovis* disease and human immunodeficiency virus coinfection, showing tuberculosis to be an opportunistic disease in immunodepressed patients (5, 7).

In Spain, less than 1% of clinically diagnosed cases of tuberculosis that are subsequently proven bacteriologically are attributed to *M. bovis* (28). From December 1993 to February 1995, 19 cases of primary *M. bovis* tuberculosis were detected in two big hospitals in central Spain (12). Afterwards, the outbreak spread to other cities and countries (18, 23, 27). These human isolates were resistant to 11 drugs (12). These isolates were characterized by spoligotyping (direct variable repeat [DVR] spacer oligonucleotide typing [15] and restric-

tion fragment length polymorphism-IS6110 [RFLP-IS6110]) (32), showing two different profiles, group A and group B, by both techniques (3).

Advances in molecular characterization have provided tools to enhance our knowledge of *M. bovis* dissemination and tuberculosis control. PCR-based characterization techniques such as spoligotyping (15) and mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) variable-number tandem repeat (VNTR) typing (9, 31) have been adopted in most laboratories for *M. bovis* typing because they are faster, simpler, and cost-effective, with the added advantage that results are qualitative (present or absent or in the form of a number). The degree of differentiation and reproducibility is good, but spoligotyping has a lower discriminatory power than MIRU-VNTR (1, 16).

The target of this study was to search for the existence of *M. bovis* isolates of animal origin with the same spoligotyping pattern and, if found, to determine whether or not human and animal *M. bovis* isolates are clonal using molecular characterization. This finding may indicate direct or indirect cattle-to-human transmission.

### Surveillance and monitoring system of animal tuberculosis.

As part of the surveillance and monitoring system of animal tuberculosis employed by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, we maintain a Spanish database of spoligotyping profiles of *M. bovis* of domestic and wild animal origin, which consists of around 3,500 strains grouped in 200 spoligotypes. We identified the same profile involved in the multidrug-resistant (MDR) human outbreak (3) in only three *M. bovis* isolates from three cattle in a farm in central Spain (Hexacode 63-5F-5E-7F-FF-60, SB0426; <http://www.mbovis.org>).

***M. bovis* isolates.** The first (93/R1) and the last (95/R4) isolates of the human outbreak of MDR *M. bovis* in the hospital in Madrid, previously classified within the group A (12), and the three isolates from cattle slaughtered in the year 2000 (00/487, 00/491, and 00/583), which shared the same spoligotyping profile, SB0426 (Fig. 1), were studied. Isolates were

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 3943721. Fax: 34 91 3943795. E-mail: [alaranaz@vet.ucm.es](mailto:alaranaz@vet.ucm.es).

† Supplemental material for this article may be found at <http://jcm.asm.org/>.



FIG. 1. Spoligotyping pattern (SB0426) found in two MDR *M. bovis* isolates from humans (R1/93 and R4/95) and three cattle *M. bovis* isolates from the same farm (00/487, 00/491, and 00/583). Spoligotyping was performed on a commercial membrane (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands) following a standard protocol (15). A clinical isolate of *M. tuberculosis* was used as a control.

grown on Löwenstein Jensen with pyruvate or Coletso media (Biomedics, Madrid, Spain).

**Drug susceptibility.** The susceptibility test of the cattle isolates was performed by the standard proportion method (4) using the following antibiotics: isoniazid (INH; 0.2 and 1 µg/ml), rifampin (RIF; 1 µg/ml), streptomycin (2 and 10 µg/ml), ethambutol (5 and 10 µg/ml), and ofloxacin (2.5 µg/ml). The cattle isolates were sensitive to the antibiotics tested, unlike the human isolates, which were described as resistant to these drugs.

**DR region polymorphism.** A loopful of each *M. bovis* isolate was resuspended in 200 µl of sterile purified water, heat inactivated for 10 min, and used as template. The 5' fragment of this region was amplified with primers DR681 (5' CGGCTTG TCAGCGCAGAGGAG 3') and sp15R (5' GGCAGCCCCG AGTACTCGCT 3') (Roche Molecular Biochemical, Berlin, Germany), which are based on known sequences of nucleotides 681 to 701 and genomic spacer 15, nucleotides 1321 to 1340, respectively (GenBank accession no. 929733 [genome number Z48304]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). The DNA was inoculated in a 50-µl PCR mixture containing 10× standard reaction buffer including 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), 400 µM of deoxynucleoside triphosphate (dNTP mix; Biotools), 0.64 µM of each primer, and 0.2 U of *Taq* Ultratools (Biotools). Amplification was carried out in a thermal cycler PTC-100 following the conditions as previously described (34).

PCR products were checked on 2% agarose gels and examined under UV light after staining with ethidium bromide. The amplification products obtained were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and sequenced with the DyeDeoxy (dRhodamine) Terminator cycle sequencing kit in an automatic ABI Prism 373 DNA sequencer (Applied Biosystems) (CIB Sequencing Facilities, Madrid, Spain). The sequences from the amplified products were aligned and compared with the CLUSTALW application software (<http://www.es.emblnet.org/cgi-bin/clustalw.cgi>), using the *M. bovis* AF2122/97 strain as reference (accession no. BX248343).

The available spoligotyping membrane, as described by Kamerbeek et al. (15), classified the human and animal isolates into the same group. However, the sequence analysis of the region between nucleotide 681 and the 15th spacer (given in the supplemental material) revealed hidden polymorphisms. Human and cattle *M. bovis* isolates showed differences in the presence of spacers with genomic numbers 6, 7, 8, and 11 (numbering according to van Embden et al. [33]) (Table 1), which are not included in the current spoligotyping membrane.

**MIRU-VNTR analysis.** These isolates were also compared by analyzing nine MIRU-VNTR loci (9, 25, 29, 31). PCR was performed as previously described. Amplicon sizes were estimated by electrophoresis on a 2.5% agarose gel at 45 V for 2 h, using a 100-bp ladder (Biotools), and the number of repeats was calculated ([www.ibl.fr/mirus/mirus.html](http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html)) (9, 25, 29).

The cattle and human isolates differed in a copy at ETR-A (6 and 5 copies, respectively) and at QUB-3232 (7 and 6 copies, respectively) (Fig. 2). However, cattle and human groups did not differ in the number of copies at ETR-B (4 copies), QUB-11a (10 copies), QUB-11b (2 copies), QUB-26 (5 copies), MIRU 4 (3 copies), MIRU 20 (2 copies), and MIRU 40 (2 copies).

The molecular characterization rules out these cattle isolates as direct sources of the MDR human outbreak. Spoligotyping is considered a useful typing method for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms, at least at the level of a first screening (15, 24), as has been shown in its application in routine epidemiological studies in animal isolates (2, 13). However, its level of discrimination may not be enough to establish the definitive identity. In that sense, these results highlight that a combination of techniques is required for appropriate discrimination, even for those spoligotypes that have a low frequency. Furthermore, the design of a new spoligotyping membrane that complements the available one would be essential to improving the degree of strain differentiation.

Polymorphic MIRU-VNTR loci have been exploited for *M. bovis* typing (14, 26, 29, 30), although in this study only two out of the nine loci tested were able to distinguish both groups of isolates. VNTR typing could be a good discriminatory typing method, nevertheless, this technique is not yet standardized, and it is necessary to assess the discriminatory power of each polymorphic locus alone and in combination with others before its extended use. Due to the allelic diversity of loci among

TABLE 1. Presence or absence of spacers detected by sequencing of a fragment of the 5' region of the DR locus (accession no. BX248343)

Isolate(s) tested	Detection of DVR for genomic order (membrane order) <sup>a</sup> :														
	1	2 (1)	3 (2)	5	6	7	8	11	12 (4)	13 (5)	14 (6)	15 (7)			
AF2122/97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Human	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cattle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Spacers are numbered according to a previous designation for oligonucleotide (33) and as bound to the membrane (15). +, presence of the DVR (direct repeat and spacer); -, absence of the DVR. The spacers 4, 9, and 10 are absent in the reference strain and studied isolates.



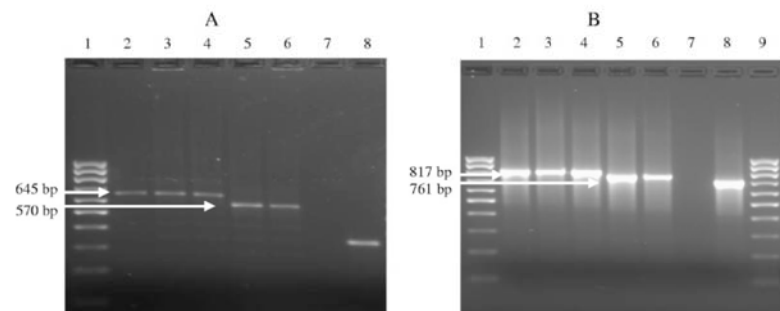


FIG. 2. MIRU-VNTR results at ETR-A (A) and QUB-3232 (B) (polymorphic loci) in the cattle and human *M. bovis* isolates. Lanes 1 and 9, 100-bp ladder; lane 2, 00/487; lane 3, 00/491; lane 4, 00/583; lane 5, 93/R3; lane 6, 95/R4; lane 7, negative control; lane 8, PCR positive control (*Mycobacterium tuberculosis*, clinical isolate).

*M. bovis* isolates in different geographical areas, the most appropriate combination of VNTRs for molecular epidemiological studies should be investigated. As has been established for spoligotyping patterns, a database of VNTR profiles would facilitate the tracking of *M. bovis* strains.

To date, we have not identified an animal origin for the human outbreak. Risk of infection from livestock has been reduced as a result of eradication programs. Nevertheless, other hazards have emerged that should be controlled, such as consumption of handmade raw-milk products (19, 35) or contact with *M. bovis*-infected game animals (2, 10, 22).

It is tempting to speculate about the origin of the human isolates. In the 1950s to 1960s the use of INH as a growth promoter in cattle before slaughtering was a common practice in Spain and might have resulted in the development of resistance. We hypothesize that the first human isolate may be a reactivation of an infection acquired at that time. Because diagnosis is commonly based on commercial probes directed to the *M. tuberculosis* complex, this isolate may have been misdiagnosed as *M. tuberculosis*. The treatment of the patient with the recommended therapy of INH, RIF, and pyrazinamide (to which all *M. bovis* isolates are naturally resistant) would have been in fact a monotherapy with RIF that led to multidrug resistance.

In summary, the results obtained with detailed molecular characterization allowed us to distinguish the human and cattle *M. bovis* isolates and determine that to date, there is no evidence of Spanish animal origin (at least, in recent times) of the multidrug-resistant human outbreak. Therefore, the initial hypothesis of nosocomial infection (12) seems to be the most credible. Spoligotyping may not be useful to determine that two strains are closely related without the support provided by basic epidemiology. Therefore, the application of other techniques is needed. In addition, both human and bovine tuberculosis monitoring are essential in the control and eradication programs of tuberculosis.

A. Aranaz has a fellowship from the Ramon y Cajal Programme (Spanish Ministry of Science and Technology/U.C.M.). This research was funded by project AGL 2001-2029 of the Spanish Ministry of

Science and Technology and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food.

We thank the staff of the SADNA (C.I.B. Madrid) for sequencing. We are grateful to M. Gilmour for careful revision of the manuscript. We thank A. Cabello, J. L. Paramio, and J. L. Sáez-Llorente for their continuous encouragement.

#### REFERENCES

- Allix, C., K. Walravens, C. Sagerman, J. Godfroid, P. Supply, and M. Fauville-Dufaux. 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 44:1951-1962.
- Aranaz, A., L. de Juan, N. Montero, C. Sánchez, M. Galka, C. Delso, J. Álvarez, B. Romero, J. Bezos, A. I. Vela, V. Briones, A. Mateos, and L. Domínguez. 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42:2602-2608.
- Blázquez, J., E. de los Monteros, S. Samper, C. Martín, A. Guerrero, J. Cobo, J. van Embden, F. Baquero, and E. Gómez-Mampaso. 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol.* 35:1390-1393.
- Canetti, G., N. Rist, and J. Grosset. 1963. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacterial drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris)* 27:217-272.
- Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163:1009-1021.
- Cousins, D. V., and D. J. Dawson. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3:715-721.
- Dankner, W. M., N. J. Waecker, M. A. Essey, K. Moser, M. Thompson, and C. E. Davis. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 72:11-37.
- Fanning, A., and S. Edwards. 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *Lancet* 338:1253-1255.
- Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144:1189-1196.
- Gortázar, C., J. Vicente, S. Samper, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Gavin, R. A. Juste, C. Martín, P. Acevedo, M. de la Puente, and U. Hoffe. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet. Res.* 36:43-52.
- Grange, J. M., and M. D. Yates. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40:137-151.
- Guerrero, A., J. Cobo, J. Fortún, E. Navas, C. Quereda, A. Asensio, J. Cañón, J. Blázquez, and E. Gómez-Mampaso. 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 350:1738-1742.
- Haddad, N., A. Ostyn, C. Karoui, M. Masselot, M. F. Thorel, S. L. Hughes,

- J. Inwald, R. G. Hewinson, and B. Durand. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3623–3632.
14. Hilty, M., C. Diguimbaye, E. Schelling, F. Baggi, M. Tanner, and J. Zinsstag. 2005. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet. Microbiol.* **109**: 217–222.
  15. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907–914.
  16. Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M. C. Gutiérrez, W. H. Haas, S. Panaiotov, R. A. Skuce, P. Supply, A. G. van der Zanden, and D. van Soolingen. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5628–5638.
  17. LoBue, P. A., W. Betacourt, C. Peter, and K. S. Moser. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994–2000. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **7**:180–185.
  18. Long, R., E. Nibert, S. Chomyc, J. van Embden, C. McNamee, R. R. Duran, J. Talbot, and A. Fanning. 1999. Transcontinental spread of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**:2014–2017.
  19. Milian, F., L. M. Sánchez, P. Toledo, C. Ramírez, and M. A. Santillan. 2000. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Queretaro, Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**:13–19.
  20. Nitta, A. T., L. S. Knowles, J. Kim, E. L. Lehnkering, L. A. Borenstein, P. T. Davidson, S. M. Harvey, and M. L. De Koning. 2002. Limited transmission of multidrug-resistant tuberculosis despite a high proportion of infectious cases in Los Angeles County, California. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**:812–817.
  21. O'Reilly, L. M., and C. J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis.* **76**(Suppl. 1):1–46.
  22. Parra, A., J. Larrasa, A. García, J. M. Alonso, and J. H. de Mendoza. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet. Microbiol.* **110**:293–300.
  23. Rivero, A., M. Márquez, J. Santos, A. Pinedo, M. A. Sánchez, A. Esteve, S. Samper, and C. Martín. 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin. Infect. Dis.* **32**:159–161.
  24. Roring, S., D. Brittain, A. E. Bunschoten, M. S. Hughes, R. A. Skuce, J. D. van Embden, and S. D. Neill. 1998. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet. Microbiol.* **61**:111–120.
  25. Roring, S., A. Scott, D. Brittain, I. Walker, G. Hewinson, S. Neill, and R. Skuce. 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2126–2133.
  26. Roring, S., A. N. Scott, H. R. Glyn, S. D. Neill, and R. A. Skuce. 2004. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet. Microbiol.* **101**: 65–73.
  27. Samper, S., C. Martín, A. Pinedo, A. Rivero, J. Blázquez, F. Baquero, D. van Soolingen, and J. van Embden. 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* **11**:1237–1242.
  28. Sauret, J., R. Jolis, V. Ausina, E. Castro, and R. Cornudella. 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber. Lung Dis.* **73**:388–391.
  29. Skuce, R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. G. Hewinson, and S. D. Neill. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* **148**:519–528.
  30. Skuce, R. A., S. W. McDowell, T. R. Mallon, B. Luke, E. L. Breadon, P. L. Lagan, C. M. McCormick, S. H. McBride, and J. M. Pollock. 2005. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet. Rec.* **157**:501–504.
  31. Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* **36**:762–771.
  32. van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, and T. M. Shinnick. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 406–409.
  33. van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. Der Zeijst, and L. M. Schouls. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* **182**:2393–2401.
  34. van Soolingen, D., P. E. de Haas, P. Hermans, and J. van Embden. 1995. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. The National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
  35. Winter, A., C. Driver, M. Macarraig, C. Clark, S. S. Munsiff, C. Pichardo, J. Jereb, P. LoBue, and M. Lynch. 2005. Tuberculosis cases caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001–2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **54**:605–608.



## Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain

M. Tariq Javed<sup>1</sup>, Alicia Aranaz\*, Lucía de Juan, Javier Bezos, Beatriz Romero, Julio Álvarez, Cristina Lozano, Ana Mateos, Lucas Domínguez

Grupo de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 29 December 2006; received in revised form 19 April 2007; accepted 21 April 2007

### KEYWORDS

Spoligotyping;  
Spacers;  
*Mycobacterium bovis*;  
*Mycobacterium caprae*

### Summary

Spoligotyping is a typing tool used worldwide for epidemiological studies on *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms; however it has received little attention regarding improvement of its discriminatory power (DP). In this study, we have evaluated a spoligotyping membrane prepared with 25 novel spacer sequences selected from a previous study [van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002;40:4628–39] on 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* Spanish isolates in comparison with the traditional spoligotyping membrane. The results obtained by combining the two membranes together revealed an improvement of 45 patterns instead of 31. The spacers used in the second membrane were able to distinguish 8 out of the 16 *M. bovis* types that had more than one isolate. Seven of these types were differentiated into two subtypes with the second-generation membrane, while spb-7, the most prevalent in Spain, was further differentiated into eight subtypes. This second-generation membrane also differentiates *M. bovis* from *M. caprae*. A set of 39 spacers (1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 23, 26–32, 37, 44–49, 51–54, 56 and 57) contain all the DP for both *M. bovis* and *M. caprae* isolates; and a set of 35 spacers (1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 26–32, 37, 44–48, 52–54 and 57) had all the DP for the *M. bovis* isolates. Our results show that the research on new spacers and the design of a new membrane may be useful for epidemiological studies of *M. bovis* and *M. caprae* isolates.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. Tel.: +34 91 3943721; fax: +34 91 3943795.

E-mail address: [alaranaz@vet.ucm.es](mailto:alaranaz@vet.ucm.es) (A. Aranaz).

<sup>1</sup>Present address: Department of Veterinary Pathology, University of Agriculture, 38040 Faisalabad, Pakistan.



## Introduction

*Mycobacterium bovis* and *M. caprae* are important animal pathogens within the *M. tuberculosis* complex. *M. bovis*, the main etiologic agent of bovine tuberculosis, can infect a wide range of domestic and wild animals.<sup>2,3</sup> Many animals, such as badgers, ferrets, wild boars, pigs and deer are believed to act as vectors for transmission to livestock.<sup>4,5</sup> Some animal species have been associated with direct or indirect transmission to humans.<sup>6–11</sup> *M. caprae*, initially described as the causative agent of tuberculosis in goats,<sup>12</sup> has been found in cattle and other host species (red deer, wild boar) in central and southern European countries.<sup>13–15</sup> Isolation from human beings has also been described.<sup>16,17</sup>

Molecular typing of *M. tuberculosis* complex isolates is a useful tool for epidemiological and phylogenetic studies,<sup>18–21</sup> and has been deployed effectively in identifying outbreaks.<sup>22</sup> One of the most widely used typing methods for *M. tuberculosis* complex isolates is spoligotyping.<sup>23</sup> This method ascertains the DNA polymorphism in the direct repeat (DR) locus of DNA of *M. tuberculosis* complex isolates. The DR locus contains multiple, highly conserved 35–36 base pair DRs interspersed with non-repetitive spacer sequences of 34–41 base pair.<sup>24</sup> The spoligotyping method is based on PCR amplification of the DR locus and its hybridization with a membrane that has a set of covalently linked oligonucleotides (spacer sequences). The differences in the spoligotype patterns are mainly due to deletions of the direct variable repeats (DVRs) in the DR region of the DNA.<sup>25,26</sup> The spoligotyping method is easy to perform, is faster than other typing methods, and can identify and type the *M. tuberculosis* complex isolates simultaneously. It also has an advantage over IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP) when limited numbers of copies of this IS are present, such as *M. bovis* isolates.<sup>27–31</sup> For these reasons, spoligotyping gained widespread acceptance as a first line method. However, its limited discriminatory power (DP) in comparison with some other typing methods including RFLP (isolates with five or more IS6110 copies) and Variable Number Tandem Repeats (VNTR) analysis is a drawback.<sup>32–34</sup>

The spoligotyping membrane currently in use in different laboratories consists of a set of 43 spacer oligonucleotides derived from *M. tuberculosis* reference strain H37Rv (37 spacers) and *M. bovis* BCG strain P3 (6 spacers).<sup>23</sup> Detailed studies on the DR locus of *M. tuberculosis* complex isolates reported 94 spacer sequences to be present.<sup>26,35</sup> Recently, few studies have been performed including a new set of spacers in the so-called second-generation spoligotyping membrane. The results with 25 additional spacers for characterization of *M. tuberculosis* and *M. africanum* isolates were encouraging<sup>1,36</sup> but to our knowledge, they have not been extensively tested on other *M. tuberculosis* complex isolates. The objective of this study was to evaluate the new spacers for the discrimination of *M. bovis* and *M. caprae* isolates. A test panel of *M. bovis* and *M. caprae* isolates from various animal sources and locations within Spain were characterized in parallel with the traditional and the second-generation spoligotyping membranes. The results indicate that adding these spacers would increase discrimination of *M. bovis* strains.

## Materials and methods

### Mycobacterial strains

A total of 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* isolates were included in the study. These isolates were cultured from samples from a variety of domestic (cattle, goats) and wild animal (wild boar, deer) species originating from different geographic areas of Spain. The selection of isolates followed two criteria: (1) isolates typed in the laboratory from January to October 2005 ( $n = 216$ ) as a part of the routine diagnosis protocol; (2) selected isolates ( $n = 180$ ) from our culture collection isolated during different years (1998–2005). This selection was done to evaluate the ability of the technique to subtype patterns of prevalent spoligotypes.

### Bacterial growth and chromosomal DNA isolation

The mycobacterial strains were grown in Coletsos or 0.2% (wt/vol) pyruvate-enriched Löwenstein Jensen media (Bio-medics, Madrid, Spain). Bacterial growth was recovered from the tubes, suspended in sterile purified water, heat inactivated for 10 min and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  till further use. This crude supernatant DNA was used for the PCR.

### Spoligotyping

PCR of the DR locus was performed with heat-treated cell suspensions as described previously.<sup>23</sup> A clinical isolate of *M. tuberculosis* and sterile purified water were used as control in every batch of tests. The amplified DNA was tested using two membranes: a commercial membrane containing the 43 spacers described earlier<sup>23</sup> (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands), and a second-generation membrane prepared in our laboratory. The same PCR product was used for hybridization on both membranes. The hybridization conditions and detection system were the same for both membranes. The membranes were stored damp after use in a sealed plastic bag at  $4^{\circ}\text{C}$  until reused.

### Preparation of second-generation membrane for spoligotyping

The selection of a set of 25 oligonucleotides was based on previous studies.<sup>1,26</sup> These 25 oligonucleotides with amino-link were obtained from Roche (Roche TIB MOLBIOL, Berlin) and numbered from 44 to 68<sup>1</sup> (they correspond to genome spacers 1, 5–11, 16, 17, 45, 48–50, 54–61 and 66–68;<sup>26</sup>). They were covalently bound to a membrane as previously described.<sup>37</sup> In short, the negatively charged membrane Biodyne C (Pall Biosupport, Portsmouth, UK) was activated by using 16% (wt/vol) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (Sigma, Madrid, Spain). The oligonucleotides were applied to the membrane in parallel by using a miniblotted system (MN45; Immunetics, Cambridge, MA, USA). The membrane was then inactivated by using 100 mM NaOH and washed in  $2 \times$  SSPE [360 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA (pH 7.2)] supplemented with 0.1% sodium dodecyl sulphate and stored in a sealed plastic bag

at 4 °C. The optimal concentration of each oligonucleotide bound to the membrane was determined in our laboratory after repeated testing of selected isolates.

### Reproducibility

The reproducibility of pattern results was confirmed by the repeated testing of heat-treated supernatant prepared from 19 isolates. These were re-tested four times. Thereafter, besides the controls, one or two samples from previous testing were included for re-checking the reproducibility. As a good practice, two persons read the patterns independently. A small number of samples ( $n = 3$ ) giving weak patterns were re-tested for a clear reading of results.

### Patterns nomenclature

The patterns obtained with the traditional membrane were allocated a prefix and a number; the prefix “spb-” for the classical *M. bovis* isolates and “spc-” for patterns with the characteristics of *M. caprae*. Numbering follows a correlative order as they were found.<sup>12,38</sup> For the second-generation membrane, patterns were allocated a prefix and a number; the prefix “sp2m” was used, irrespective of the *M. bovis* or *M. caprae* strain, where “sp” stands for spoligotyping, and “2m” for second-generation membrane. Numbering followed the order with higher number of isolates to lower number of isolates in each pattern (sp2m-) with the only exception of sp2m-9.

### Analysis of results

DP was calculated by using the online tool ([http://www.insilico.com/mini\\_tools/discriminatory\\_power/index.php](http://www.insilico.com/mini_tools/discriminatory_power/index.php)). The DP<sup>39</sup> uses the formula of Simpson's index of diversity. Interactive data analysis tool in the SAS statistical software version 9.1<sup>40</sup> was used to sort the results, these were then categorized manually. LISREL 8.7 software package<sup>41</sup> was used to obtain the patterns and their frequency in the first-generation membrane, the second-generation spoligotyping membrane and both membranes together.

## Results

### Preparation of the second-generation membrane

A membrane was prepared with a set of 25 oligonucleotides numbered from 44 to 68. The results of spacers are presented on the basis of their position on the membrane rather than their position in the genome. There were slight differences in the strength of signal even after the concentration of each spacer was optimized. Specific weaknesses were that spacer 46 gave a uniform comparably weak signal for the strains that had this spacer; spacer 51 gave consistently none, strong or medium signal and the results were read as 0, 1 or 2, respectively; and spacer 55 gave a very weak and inconsistent signal and the results for this spacer were not included. A clinical isolate of *M. tuberculosis* was used as positive control, which gave a strong hybridization signal to spacer 67 and weak signal to spacer 68. The results of the samples tested in replicates confirmed the reproducibility of the patterns.

### Number of spoligotyping patterns of *M. bovis* and *M. caprae*

Thirty-one different spoligotypes were identified among the 308 *M. bovis* (26 patterns) and 88 *M. caprae* (5 patterns) isolates studied with the traditional spoligotyping membrane. A total of 19 spoligotyping patterns were obtained by the second-generation spoligotyping membrane, 17 patterns correspond to *M. bovis* isolates and 2 to the *M. caprae* isolates (Table 1).

### Combined analysis with both spoligotyping membranes

When data were analysed by combining the results of the two membranes for both *M. bovis* and *M. caprae* isolates, a net gain of 14 (45%) spoligotyping patterns was obtained, compared with traditional 43 spacer spoligotyping, resulting in a total of 45 spoligotyping patterns (Table 1). However, this increase in patterns was observed only for the *M. bovis*

**Table 1** Discriminatory power (DP) of traditional and second-generation spoligotyping membrane used alone and in combination.

	First spoligotyping membrane	Second spoligotyping membrane	First and second spoligotyping membranes combined
<i>M. bovis</i> and <i>M. caprae</i> isolates combined ( $n = 396$ )			
No. of types	31	19	45
DP	0.892	0.785	0.920
<i>M. bovis</i> ( $n = 308$ )			
No. of types	26	17	40
DP	0.856	0.724	0.902
<i>M. caprae</i> ( $n = 88$ )			
No. of types	5	2	5
DP	0.580	0.023	0.580

isolates (54%, a gain of 14 patterns), resulting in 40 spoligotyping patterns in total. The addition of novel spacers increased the discriminatory index to 0.902, instead of 0.856 obtained with the 43-spacers format. The results on DP of each membrane and both membranes, along with the number of spoligotyping patterns for *M. bovis* and *M. caprae* isolates together and *M. bovis* isolates alone are presented in Table 1.

#### Spoligotyping of *M. bovis* isolates

The frequency of the types obtained by the second-generation membrane is indicated in Table 2. The most common type among the *M. bovis* isolates was sp2m-1, it was found in 139 out of the 308 isolates studied (45.13%). Sp2m-3 to sp2m-6 were found in 22.4–6.7% of isolates, while the other spoligotyping patterns were observed in less than 1.5% of the isolates. All *M. bovis* isolates tested in this study lacked spacers 49 and 50 (genomic order 9 and 10), 56 (genomic order 49) and 58–68 (genomic order 54–61, and 66–68), as has been described previously.<sup>1,26</sup>

#### Spoligotyping of *M. caprae* isolates

Traditional spoligotyping grouped the 88 *M. caprae* isolates into five types. Eighty-seven of the *M. caprae* isolates

presented the same pattern by the second-generation membrane (sp2m-2). Differences between *M. bovis* and *M. caprae* were also detected with second-generation spoligotyping; all *M. caprae* isolates harboured the spacers 49 and 56, and lacked 44–48 (genomic order 1, and 5–8), 50, 52–53 (genomic order 16–17) and 58–68. The remaining *M. caprae* isolate (sp2m-15) lacked all spacers included in this second-generation membrane. Further, spacer 51 gave a weak hybridization signal in all *M. caprae* isolates (with the exception of isolate sp2m-15), although some of the *M. bovis* strains also gave a weak signal to this spacer.

#### Subtypes with second-generation membrane

Sixteen *M. bovis* types obtained with the first-generation membrane grouped more than one isolate. Of these 16 types, the second-generation membrane was able to differentiate 8 of them into further subtypes. The results of spoligotyping patterns with the first-generation membrane and their subtyping with second-generation membrane are shown in Table 3. The spb-7, the most prevalent pattern in Spain (25.5% of isolates), was further differentiated into eight subtypes, each type being present with a different frequency (57.8–1.2%). Other frequent spoligotypes spb-6, spb-13 and spb-16, were only marginally

**Table 2** Patterns obtained by second-generation spoligotyping with 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* isolates.

Pattern name	Spacers																No. of isolates (%)
	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58–68 <sup>a</sup>	54–61, 66–68 <sup>b</sup>	
Sp2m-1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	–	0	1	0	0	139 (35)
Sp2m-2 <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	–	1	1	0	0	87 (22)
Sp2m-3	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	–	0	0	0	0	69 (18)
Sp2m-4	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	–	0	1	0	0	37 (9)
Sp2m-5	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	–	0	1	0	0	25 (6)
Sp2m-6	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	–	0	1	0	0	19 (5)
Sp2m-7	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	–	0	1	0	0	4 (1)
Sp2m-8	1	1	0	0	0	0	0	2	1	1	1	–	0	0	0	0	3 (0.75)
Sp2m-9	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Sp2m-10	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	–	0	1	0	0	2 (0.5)
Sp2m-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	0	1	0	0	2 (0.5)
Sp2m-12	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Sp2m-13	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	–	0	0	0	0	1 (0.25)
Sp2m-14	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	–	0	0	0	0	1 (0.25)
Sp2m-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	0	0	0	0	1 (0.25)
Sp2m-16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Sp2m-17	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Sp2m-18	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Sp2m-19	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	–	0	1	0	0	1 (0.25)
Total																	396

<sup>a</sup>Spacers numbered 44–68 as bound to membrane following previous designation (1).

<sup>b</sup>Corresponding genomic order (26).

<sup>c</sup>Patterns in bold letter are from *M. caprae* isolates. 1, presence of the DVR (direct repeat and spacer); 0, absence of the DVR; 2, consistent weak signal (spacer 51).



**Table 3** Subtyping of *M. bovis* patterns obtained with traditional spoligotyping by the second-generation spoligotyping membrane.

Pattern in first membrane				Pattern in second membrane	
Pattern name			No. of isolates (%)	Pattern name	No. of isolates (%)
Our laboratory	The <i>M. bovis</i> spoligotype data base <sup>a</sup>	Hex code <sup>56</sup>			
Spb-3 <sup>a</sup>	SB0120 <sup>b</sup>	6F-5F-5F-7F-FF-60 <sup>c</sup>	4 (1.3)	Sp2m-5	3 (0.97)
				Sp2m-9	1 (0.32)
Spb-6	SB0265	6D-5F-5E-7F-FF-60	41 (13.27)	Sp2m-1	40 (12.95)
				Sp2m-3	1 (0.32)
Spb-7	SB0121	6F-5F-5E-7F-FF-60	83 (26.86)	Sp2m-1	48 (15.53)
				Sp2m-3	8 (2.59)
				Sp2m-5	18 (5.83)
				Sp2m-6	1 (0.32)
				Sp2m-7	4 (1.29)
				Sp2m-10	2 (0.65)
				Sp2m-12	1 (0.32)
				Sp2m-17	1 (0.32)
Spb-13	SB0134	63-5F-5F-7F-FF-60	19 (6.15)	Sp2m-1	1 (0.32)
				Sp2m-6	18 (5.83)
Spb-16	SB0339	6F-5F-5E-78-7F-60	51 (16.50)	Sp2m-1	1 (0.32)
				Sp2m-3	50 (16.18)
Spb-21	SB0426	63-5F-5E-7F-FF-60	3 (0.97)	Sp2m-8	2 (0.65)
				Sp2m-14	1 (0.32)
Spb-142	SB1188	6F-5F-0E-7F-FF-60	4 (1.3)	Sp2m-1	1 (0.32)
				Sp2m-3	3 (0.97)
Spb-149	SB1189	40-00-00-7F-3F-60	3 (0.97)	Sp2m-4	2 (0.65)
				Sp2m-16	1 (0.32)
Total			208 (67)		

Note: The percentage is calculated from *M. bovis* ( $n = 308$ ) isolates only as no subtyping of *M. caprae* isolates was obtained.

<sup>a</sup>[www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org).

subtyped, as they were divided in to only two groups each, with a major group containing all isolates except one.

#### DP of new spacers

The spoligotyping patterns obtained by removing individual spacers 44–57 for both *M. bovis* and *M. caprae* isolates, and for *M. bovis* isolates alone, along with DP, are shown in Table 4. Removing spacers 44, 45, 52–54 and 57 each resulted in loss of one or more spoligotyping pattern and hence loss of DP. A maximum loss of three and two spoligotyping patterns was observed when spacer 57 was omitted from analysis for both *M. bovis* and *M. caprae* isolates together and for *M. bovis* isolates alone, respectively (Table 4). The respective loss of DP after removal of spacer 57 was 15.8% and 28.3%, which was the highest among all the spacers included in second-generation spoligotyping membrane. Regarding the impact of removal of results of spacers in the ability for subtyping patterns

obtained with the traditional membrane, the removal of spacer 52 would result in loss of subtyping spb-3 and spb-7 (one subtype), removal of spacer 54 would result in loss of subtyping spb-7 (one subtype) and removal of spacer 57 would result in loss of subtyping spb-6, spb-7 (one subtype), spb-16 and spb-142.

#### DP of spacers

The DP obtained with all spacers and removing individual spacers from 1 to 57 (both membranes) for both *M. bovis* and *M. caprae* isolates together, and for *M. bovis* isolates alone is presented in Table 5. Individual removal of results of 13 spacers (1, 2, 6, 13, 15, 17, 21, 28, 37, 52–54 and 57) resulted in loss of one or more patterns compared to results obtained with the 68-spacers format. The combined results of these 13 spacers gave 29 distinct spoligotype patterns, with a total loss of 11 patterns; while including all other spacers except the aforementioned spacers reduced the

**Table 4** Number of patterns and discriminatory power (DP) obtained with second-generation spoligotyping membrane from a total of 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* isolates.

Spacers	<i>M. bovis</i> and <i>M. caprae</i> isolates			<i>M. bovis</i> isolates only		
	No. of patterns	DP	Loss of DP (%)	No. of patterns	DP	Loss of DP (%)
All spacers	19	0.7851	–	17	0.7236	–
All except:						
44	18	0.7850	0.01	16	0.7235	–
45	17	0.7833	0.23	15	0.7206	0.14
46	19	0.7851	–	17	0.7236	–
47	19	0.7851	–	17	0.7236	–
48	19	0.7851	–	17	0.7236	–
49	19	0.7851	–	17	0.7236	–
51	19	0.7851	–	17	0.7236	–
52	16	0.7807	0.56	14	0.7164	0.98
53	17	0.7848	0.03	15	0.7231	0.07
54	17	0.7408	5.64	15	0.6505	10.10
56	19	0.7851	–	17	0.7236	–
57	16	0.6610	15.81	15	0.5187	28.32

Note: LISREL 8.7 software was used to obtain the number of patterns for total and selected spacers, and the online tool [http://www.in-silico.com/mini\\_tools/discriminatory\\_power/index.php](http://www.in-silico.com/mini_tools/discriminatory_power/index.php) was used to obtain the DP.

**Table 5** Number of patterns and discriminatory power (DP) obtained with the spacers by a combination of both spoligotyping membranes together for *M. bovis* and *M. caprae* isolates.

Spacers	<i>M. bovis</i> and <i>M. caprae</i> isolates			<i>M. bovis</i> isolates		
	No. of Patterns	DP	Loss of DP (%)	No. of patterns	DP	Loss of DP (%)
All spacers (68)	45	0.9204	–	40	0.9023	–
All except:						
1 <sup>a</sup>	44	0.9203	0.01	39	0.9022	0.01
2	44	0.9198	0.07	39	0.9013	0.11
6	43	0.8959	2.66	38	0.8611	4.57
13	44	0.9203	0.01	39	0.9022	0.01
15	44	0.9186	0.20	39	0.9023	–
17	44	0.9204	–	39	0.9023	–
21	44	0.9197	0.08	39	0.9012	0.12
28	44	0.9198	0.07	39	0.9013	0.11
37	44	0.9198	0.07	39	0.9013	0.11
52	43	0.9192	0.13	38	0.9003	0.22
53	44	0.9204	–	39	0.9023	–
54	44	0.9094	1.20	39	0.8842	2.01
57	41	0.9143	0.66	36	0.8923	1.11
Spacers 1, 2, 6, 13, 15, 17, 21, 28, 37, 52–54, 57				29	0.8782	2.74
All spacers excluding 1, 2, 6, 13, 15, 17, 21, 28, 37, 52–54, 57				22	0.7380	22.26

Note: LISREL 8.7 software was used to obtain the number of patterns for total and selected spacers, while the online tool at [http://www.in-silico.com/mini\\_tools/discriminatory\\_power/index.php](http://www.in-silico.com/mini_tools/discriminatory_power/index.php) was used to obtain the DP.

<sup>a</sup>Spacers whose removal resulted in a number of pattern lower than that obtained by using results of all spacers together. For other spacers, the results are not presented as there was no loss of pattern.

number of patterns to 22 patterns with a loss of 18 patterns for *M. bovis* isolates.

A search for the essential spacers that provide all the information revealed that a set of 39 spacers contained all

the DP obtained with both membranes for this panel of *M. bovis* and *M. caprae* isolates and includes membrane spacers 1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 23, 26–32, 37, 44–49, 51–54, 56 and 57. A set of 35 spacers had all the DP used in

both membranes for these *M. bovis* isolates and includes membrane spacers 1, 2, 4–8, 10–15, 17–21, 26–32, 37, 44–48, 52–54 and 57.

## Discussion

Typing of *M. tuberculosis* complex isolates has great significance in understanding the epidemiology and phylogeny of the organisms. Spoligotyping is the most widespread among the typing techniques. This technique has a significant advantage over the other typing methods, being easy to perform and the results are easy to interpret. However, despite its extensive use and impact [a recent search in the PubMed website of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) retrieved 328 papers on this topic since 1996], it has received very little attention regarding improvement in terms of discrimination of isolates.

Alone or in combination with other techniques, spoligotyping has been also extensively used for *M. bovis* during the last decade. It has been useful for the study of the epidemiology of infection in livestock and wildlife, allowing detection of transmission between herds, the source of new detected cases, and the transmission of infection between domestic animals and wildlife.<sup>28,30,38,42–46</sup> A drawback of the traditional membrane is the limited DP compared to other methods, for example the recently developed VNTR analysis.<sup>34,47,48</sup> Though anticipated that a better discrimination of *M. bovis* strains would be achieved by the identification and use of spacer sequences specific to *M. bovis*,<sup>28,35</sup> the novel available spacers<sup>1,26</sup> have not been extensively tested.

In this study, we have evaluated a spoligotyping membrane prepared with 25 novel spacer sequences selected from these studies<sup>1,26</sup> on 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* Spanish isolates together with traditional spoligotyping membrane containing 43 spacer sequences.<sup>23</sup> The results obtained by combining those of the two membranes together revealed 45 patterns instead of 31 for the 396 *M. bovis* or *M. caprae* isolates. This improvement is caused by the increase in number of *M. bovis* patterns (40 patterns instead of 26). The spacers used in the second membrane were able to distinguish 8 out of the 16 *M. bovis* types that had more than one isolate. Seven of these types were differentiated into two subtypes, while the prevalent spb-7 was further differentiated into eight subtypes. This gives a significant advantage in epidemiological and phylogenetic studies. Previous studies of similar nature revealed an increase in 14 spoligotypes by using additional spacers for *M. tuberculosis* complex isolates and an increase from 18 to 26 types for *M. bovis* isolates.<sup>1</sup> Similarly, an increase of four patterns (from 41 to 45) with *M. africanum* isolates with 68 spacer oligonucleotides as used in present study has been reported.<sup>36</sup> However, we were unable to get additional patterns for the *M. caprae* isolates.

The second-generation membrane offered further characterization to distinguish *M. bovis* and *M. caprae* isolates. The current DR regions seem to have evolved from a common ancestor mainly to successive deletions of single or multiple DVRs from an archetypal DR region.<sup>26</sup> Therefore, the polymorphism at the DR locus has been exploited as a

help to distinguish the taxon within the *M. tuberculosis* complex.<sup>49–55</sup> In addition to the missing spacers 3, 9, 16 and 39–43 in the traditional membrane,<sup>1,27,28,35</sup> we also found that spacers 49, 50, 56, and 58–68 of the second-generation membrane are absent in all the tested *M. bovis* isolates from Spain. The absence of these spacers, as observed in present study, was also reported by van der Zanden et al.<sup>1</sup> The spacers 49 and 56, absent in *M. bovis* isolates, were present in the *M. caprae* isolates, except in the isolate with the large deletion. There were some other differences, as the lack of spacers 44–48 and 52–53 that seems to be a trademark signature to complement missing spacers 1, 3–16, 28, 30–33 and 39–43 of *M. caprae* isolates.<sup>49</sup> van der Zanden et al.<sup>1</sup> found an increase in two types (from 6 to 8) when subtyping six Spanish and three German *M. caprae* isolates, which could not be achieved in our study, though that report did not state the geographical origin of *M. caprae* isolates that were subtyped.

Though a more detailed characterization is obtained when spoligotyping the isolates with the higher number of spacers in the 57-spacer format, this is of little use in laboratories dealing with a high number of samples due to the limit in resources and the time involved to carryout the procedure. For this reason, we analysed the results to search the optimum combination of spacers to yield all the DP, eliminating the spacers which give redundant results. Hence, we sequentially omitted spacers to find out its impact on differentiation between strains. Omitting certain spacers (for instance the spacers 57 and 52 from the second membrane, and spacer 6 from the traditional one) separately in the analysis of data comprising both *M. bovis* and *M. caprae* isolates resulted in an important reduction in the number of patterns. This suggests their utility in the differentiation of the isolates, as omission of other spacers did not result in this much loss in patterns. Interestingly, individual omission of spacers and loss of patterns was associated with only 13 spacers in total from the two combined membranes. When those 13 spacers were omitted together from the analysis, we were able to get 22 patterns, while when data were analysed with only these 13 spacers yielded 29 patterns. This suggests importance of these spacers but does not rule out the significance of the other spacers. Our results also showed that spacers 52, 54 and 57 have a significant contribution in the ability for subtyping, as omitting spacer 52 resulted in loss of two subtypes, spacer 54 in one subtype and spacer 57 resulted in loss of four subtypes. Omitting these three spacers together resulted in loss of seven subtypes including the loss of three subtypes of spb-7.

The analysis of results by omitting a single spacer, or a group of spacers, at a time, revealed that a set of 39 spacers contains all the DP of the 68 spacer oligonucleotides for typing *M. bovis* and *M. caprae* isolates together, while a set of 35 spacer oligonucleotides were enough to have all the DP to differentiate *M. bovis* strains. The majority of the spacers in this selection were located upstream of IS6110, which seems to be more polymorphic in *M. bovis*.<sup>35</sup> In a previous study, a set of 40 spacer oligonucleotides has been reported to have all the DP in differentiating the *M. tuberculosis* complex isolates.<sup>1</sup> However, there were some differences in spacers between the two studies, as 13 membrane spacers (including 3, 22, 24, 25, 38–40, 43, 50, 60, 67–69) that were



reported by van der Zanden et al.<sup>1</sup> of high significance, were of little value in the characterization of the *M. bovis* isolates in our study. Conversely, membrane spacers 6, 7, 12, 15, 21, 26, 29, 47–49, 51 and 52 were found more useful, along with a total of 26 other spacers, agreed in both studies.

In summary, the use of the novel spacers to complement the traditional membrane increased the DP of spoligotyping for the characterization of *M. bovis* isolates. However, some differences exist in the usefulness of specific spacer oligonucleotides for spoligotyping, as the DP may depend on the type of *M. tuberculosis* complex species, or the geographic area. The findings from this study relate to isolates from Spain only and it would be inappropriate to extrapolate these results to other areas. Other regions should systematically analyse their *M. bovis* and *M. caprae* populations before adopting any minimal set. It would be interesting to compare the results from such studies. This fact would demand further investigation in additional spacer oligonucleotides to select a set of spacers that provide a reliable and discriminative typing system. Two different membranes could be designed for typing *M. bovis*–*M. caprae* and *M. tuberculosis* strains, though the same customized membrane must be used for each species, irrespective of the geographic origin, for comparison of patterns throughout the world and to allow construction of databases.

### Acknowledgements

A. Aranaz has a fellowship from the Ramon y Cajal Programme (Spanish Ministry of Science and Technology/U.C.M.). This research was funded by projects AGL2001-2029 and AGL2004-08092/GAN of the Spanish Ministry of Science and Technology, and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. The Higher Education Commission (Government of Pakistan) provided the financial assistance to M. Tariq Javed to travel and stay at Universidad Complutense de Madrid. The group is a partner of the Coordination Action “Veterinary European Network on Mycobacteria (VENoMYC)” funded by the European Union.

We thank Francisco J. Lozano for excellent technical help. We are grateful to Matthew Gilmour for careful revision of the manuscript. We acknowledge the comments of the two anonymous reviewers. We would like to thank L. Carbajo, J.L. Paramio and J.L. Sáez-Llorente for their continuous encouragement.

**Funding:** A. Aranaz has a fellowship from the Ramon y Cajal Programme (Spanish Ministry of Science and Technology/U.C.M.). This research was funded by projects AGL2001-2029 and AGL2004-08092/GAN of the Spanish Ministry of Science and Technology, and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. The Higher Education Commission (Government of Pakistan) provided the financial assistance to M. Tariq Javed to travel and stay at Universidad Complutense de Madrid

**Competing Interests:** None declared

**Ethical Approval:** Not required

### References

1. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002;40:4628–39.
2. De Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2001;20:86–111.
3. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc Lung Dis* 1995;76(Suppl. 1):1–46.
4. Corner LAL. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol* 2006;112:303–12.
5. De Lisle GW, Bengis RG, Schmitt SM, O'Brien DJ. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2002;21:317–34.
6. Biet F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 2005;36:411–36.
7. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;4:59–70.
8. Daloviso JR, Stretter M, Mikota SW. Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. *Clin Infect Dis* 1992;15:598–600.
9. Fanning A, Edwards S. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *Lancet* 1991;338:1253–5.
10. Georgiadi P, Patel AM, Konstantinos A. *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Aust N Z J Med* 1989;19:409–10.
11. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994;40:137–51.
12. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1263–73.
13. Erler W, Martin G, Sachse K, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J Clin Microbiol* 2004;42:2234–8.
14. Machackova M, Matlova L, Lamka J, et al. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet Med Czech* 2004;48:51–65.
15. Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann N, et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* by mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) for epidemiological and phylogenetic purposes. *J Clin Microbiol* 2005;43:4984–92.
16. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 2003;41:3070–7.
17. Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischign W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002;40:2270–2.
18. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3684–9.
19. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003;41:1963–70.
20. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Int Med* 2001;249:1–26.

21. Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003;3:125-33.
22. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999;282:2321-7.
23. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
24. Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: application of strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.
25. Fang Z, Morrison N, Watt B, Doig C, Forbes K J. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol* 1998;180:2102-9.
26. van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* 2000;182:2393-401.
27. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2734-40.
28. Cousins D, Williams S, Liébana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:168-78.
29. Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37:3217-22.
30. Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, et al. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRs, DR and IS6110 probes. *Vet Microbiol* 1998;61:111-20.
31. Zumarraga M, Martín C, Samper S, et al. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South America. *J Clin Microbiol* 1999;37:296-303.
32. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.
33. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:5628-38.
34. Skuce RA, McDowell SW, Mallon TR, et al. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet Rec* 2005;157:501-4.
35. Caimi K, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bigi F, Cataldi A. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1067-72.
36. Brudley K, Gutiérrez MC, Vincent V, et al. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *J Clin Microbiol* 2004;42:5053-7.
37. Kauffhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoe M, Top J, Schouls L. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:19-25.
38. Aranaz A, de Juan L, Montero N, et al. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42:2602-8.
39. Hunter P. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990;28:1903-5.
40. SAS Institute Inc. *Software for data analysis, release 9.1*. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2002-2003.
41. LISREL 8.7. 7383 N. Lincoln Avenue, Suite 100 Lincolnwood, IL 60712-1747 USA: Scientific Software International Inc.; 2005.
42. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Cousins D. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1998;61:311-24.
43. Haddad N, Ostyn A, Karoui C, et al. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol* 2001;39:3623-32.
44. Gortázar C, Vicente J, Samper S, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet Res* 2005;36:43-52.
45. TatocParra A, Fernández-Llario P, Tatoc A, et al. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* 2003;97:123-33.
46. Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, et al. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol* 1999;37:2766-71.
47. Roring S, Scott A, Brittain D, et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2002;40:2126-33.
48. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2006;44:1951-62.
49. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1785-9.
50. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1305-14.
51. Niemann S, Kubica T, Bange FC, et al. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol* 2004;42:3958-62.
52. Sola C, Rastogi N, Gutiérrez MC, et al. Is *Mycobacterium africanum* subtype II (Uganda I and Uganda II) a genetically well-defined subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2003;41:1345-8.
53. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canettii*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1236-45.
54. Van Soolingen D, van der Zanden AGM, de Haas PEW, et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998;36:1840-5.
55. Viana-Nero C, Gutiérrez C, Sola C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol* 2001;39:57-65.
56. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:216-9.





## **CAPÍTULO III**

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE AISLADOS  
DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* DE  
ORIGEN ANIMAL Y HUMANO FRENTE A LOS FÁRMACOS  
USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EN  
HUMANOS



## RESUMEN

*M. bovis* y *M. caprae* son bacterias zoonóticas que causan principalmente la tuberculosis en animales aunque también han sido descritas en el hombre. La implicación de *M. bovis* como patógeno humano ha estado muy relacionada con los servicios veterinarios y con los portadores de VIH, aunque en el hombre la incidencia de la infección por *M. bovis* es baja. Sin embargo, los brotes producidos por cepas multirresistentes han tenido un impacto dramático en la sociedad. Debido a ese carácter zoonótico, el ganado bovino o sus productos derivados se presumen como la fuente de infección más probable y son muy pocos los estudios que se han realizado sobre la sensibilidad antibiótica de los aislados de origen animal. El tratamiento de la tuberculosis en humanos se caracteriza por el uso combinado de tres antibióticos (isoniazida, rifampicina y pirazinamida) y los casos de cepas resistentes obligan a un cambio en la medicación, usando otros antibióticos de primera línea, como el etambutol o la estreptomicina, o de segunda línea, como las quinolonas. Por lo tanto, conocer la sensibilidad de los aislados es indispensable para un buen tratamiento de la enfermedad. El método habitual para estudiar la sensibilidad antibiótica es el antibiograma. El método de las proporciones de Canetti se considera la técnica de referencia aunque los avances en los sistemas de cultivo líquido automatizados aceleran la obtención de resultados y actualmente son la técnica de elección. Debido al lento crecimiento de estas bacterias y a la necesidad de un tratamiento eficaz e inmediato se han producido muchos avances en el campo de la genética molecular, en el que se ha demostrado una asociación entre la resistencia a los antibióticos y la aparición de mutaciones en diversos genes. Por lo tanto, la combinación de la microbiología y la rapidez de las técnicas moleculares son una buena aproximación en los estudios de sensibilidad antibiótica. Además, la identificación de la especie que está produciendo la infección es un factor a tener en cuenta a la hora del tratamiento, ya que *Mycobacterium bovis* presenta una resistencia natural a la pirazinamida.

En el presente capítulo se incluyen dos estudios encaminados a determinar la sensibilidad antibiótica de aislados del complejo *M. tuberculosis* de origen animal y humano, mediante el uso de técnicas microbiológicas (antibiograma) y el estudio de los genes implicados en la resistencia antibiótica. En el primer trabajo evaluamos la sensibilidad antibiótica de aislados de origen animal, bovino principalmente. El análisis de las secuencias de los genes implicados en la resistencia antibiótica se realizó en *M. bovis* (N=41) y de *M. caprae* (N=5). La secuenciación mostró que cinco de los nueve genes estudiados (*katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB*, y *gyrA*) presentaban mutaciones puntuales que no habían sido descritas previamente en otros organismos del complejo *M. tuberculosis* sensibles o resistentes. La presencia de estas mutaciones se estudió con más detalle sobre un mayor número de aislados con los mismos espoligotipos que las cepas que presentaron los polimorfismos. En dos de los cuatro espoligotipos estudiados se encontró una asociación entre el espoligotipo y la presencia de mutación, lo que podría sugerir que esas mutaciones puntuales están conservadas y que una única cepa sería la responsable de los brotes (diseminación clonal).

La sensibilidad antibiótica a la isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol y ofloxacina se realizó sobre 32 aislados de *M. bovis* y tres de *M. caprae*, en medios con piruvato sódico y sin él. Los resultados mostraron que los aislados fueron sensibles a los cinco antibióticos mediante el método de las proporciones. Sin embargo se detectó una interferencia entre el piruvato sódico, añadido a los medios, y la isoniazida: el 94,3% de los aislados creció en los medios con una concentración baja de isoniazida (0,2 µg/ml), y el 68,6% creció a una concentración alta de isoniazida (1 µg/ml). En los medios sin piruvato, el 34,3% de los aislados no creció mientras que el crecimiento del resto de aislados fue menor y más lento que en presencia de piruvato. Por lo tanto, estos resultados corroboran tanto la necesidad del uso del piruvato para el crecimiento de *M. bovis* como el efecto inhibitorio del piruvato sobre la isoniazida. La sensibilidad a la isoniazida se comprobó en seis aislados de *M. bovis* con crecimiento por el método de las proporciones mediante el método líquido automatizado ESP Culture System II, y todos fueron sensibles. Por lo tanto, la resistencia antibiótica en estos aislados de origen animal no existe, hecho que en el caso de transmisión de la infección de los animales al hombre no dificultaría el tratamiento.

En el segundo trabajo se abordó únicamente la resistencia a los antibióticos usados frente a la tuberculosis mediante el estudio de las mutaciones asociadas a determinados genes. Con este objeto partimos de dos aislados de origen humano representativos del brote de *M. bovis* multiresistente (a 11 antibióticos) que se dio en un hospital en Madrid en los años 90, y que posteriormente se transmitió a otros países. Mediante amplificación por PCR y secuenciación estudiamos los principales genes implicados en la resistencia antibiótica: isoniazida (*katG*, *ahpC*, *inhA*, y la región intergénica *oxyR-ahpC*), rifampicina (*rpoB*), estreptomicina (*rrs*, *rpsL*), etambutol (*embB*) y quinolonas (*gyrA*). Cinco de los nueve genes estudiados presentaron mutaciones (*ahpC*, *rpoB*, *rpsL*, *embB* y *gyrA*), y esas substituciones supusieron un cambio de aminoácido en cuatro de los genes. Además, dos mutaciones adicionales en *ahpC* y *rpsL* diferenciaron el primer y el último aislado del brote. El análisis de los genes implicados en la resistencia a la isoniazida no mostró polimorfismos asociados a la misma, por lo que el mecanismo genético de resistencia a la isoniazida se

desconoce. Sin embargo, un cambio de aminoácido en la posición 531 del gen *rpoβ* fue la causa de la resistencia a la rifampicina. También se observaron substituciones no sinónimas en ambos aislados en los genes implicados en la resistencia a la estreptomicina (AAG→AGG, Lys43Arg), etambutol (ATG→GTG, Met306Val) y a las quinolonas (TCG→CCG, Ser91Pro). Todas estas mutaciones encontradas en ambos aislados habían sido descritas previamente en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estos antibióticos.





## Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals

Beatriz Romero<sup>a</sup>, Alicia Aranaz<sup>a,\*</sup>, Javier Bezos<sup>a</sup>,  
Julio Álvarez<sup>a</sup>, Lucía de Juan<sup>a</sup>, M. Tariq Javed<sup>b</sup>, Ana Mateos<sup>a</sup>,  
Enrique Gómez-Mampaso<sup>c</sup>, Lucas Domínguez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Department of Veterinary Pathology, University of Agriculture, 38040 Faisalabad, Pakistan

<sup>c</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, 28034 Madrid, Spain

Received 11 June 2007; received in revised form 10 August 2007; accepted 15 August 2007

### KEYWORDS

*Mycobacterium bovis*;  
*Mycobacterium*  
*caprae*;  
Susceptibility testing;  
Target genes

### Summary

*Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* are zoonotic bacteria that cause tuberculosis with several clinical manifestations. We have evaluated the susceptibility to anti-tuberculosis drugs of a panel of Spanish isolates of animal origin. The analysis of the sequence of the main genes involved in resistance was performed in 41 *M. bovis* and five *M. caprae*. The *katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB* and *gyrA* genes had single nucleotide polymorphisms, not previously described in other organisms of the complex. Thirty-two *M. bovis* and three *M. caprae* isolates were tested for susceptibility to isoniazid (INH), rifampin, streptomycin, ethambutol, and ofloxacin using the standard proportion method. The results revealed that the isolates were sensitive to the five drugs. However, interference caused by sodium pyruvate in the INH test was detected: 94.3% grew at 0.2 µg INH/ml and 68.6% grew at 1 µg INH/ml. In the medium without pyruvate, 34.3% of the isolates did not grow whereas growth of the others was poor and slow. Nine *M. bovis* isolates were also tested by ESP Culture System II test and were sensitive to INH. The susceptibility of *M. bovis* to INH cannot be reliably determined using the standard proportion method due to the *M. bovis* growth requirements and the interference of pyruvate with INH.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

The main etiological agents of animal tuberculosis, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*, are zoonotic bacteria that cause human tuberculosis with several clinical manifestations.<sup>1–6</sup> *M. bovis* involvement as a human

\*Corresponding author. Tel.: +34 91 3943721; fax: +34 91 3943795.  
E-mail address: [alaranaz@vet.ucm.es](mailto:alaranaz@vet.ucm.es) (A. Aranaz).



pathogen has been mainly associated to veterinary services<sup>5,6</sup> and to primary infection in HIV-infected patients.<sup>7</sup> Recent studies relate *M. bovis* human tuberculosis to the consumption of dairy products coming from developing countries with high incidence rates of tuberculosis in livestock.<sup>8,9</sup> Recently, the report of Evans et al.<sup>10</sup> has highlighted the air borne route from animal-to-human and person-to-person transmission. Although the overall incidence of *M. bovis* infection in humans is low, the outbreaks caused by *M. bovis* strains showing multidrug resistance (MDR) [at least to isoniazid (INH) and rifampin (RIF)] have had a dramatic impact.<sup>8,11–13</sup> *M. caprae* has also been identified in humans<sup>3,4,14–16</sup>, and in some cases, contact with goats or cattle has been suggested as a likely cause.<sup>16,17</sup> Despite this fact, few studies have been developed to test the susceptibility of *M. bovis* from animal origin,<sup>13,18–21</sup> and there is no information on susceptibility of *M. caprae* isolates.

Genetic studies have demonstrated that some mutations in target genes are associated with resistance to isoniazid (*katG*, *inhA* and the intergenic region *oxyR-ahpC*), rifampin (*rpoB*), streptomycin (STR) (*rpsL*, *rrs*), ethambutol (EMB) (*embB*) and quinolones (ofloxacin, OFX) (*gyrA*, *gyrB*).<sup>22–26</sup> Most mutations have been described in *Mycobacterium tuberculosis* strains, and scarce studies have been conducted in other *M. tuberculosis* complex species. Regarding these zoonotic pathogens, an initial analysis of different genes in *M. bovis* was performed by Sreevatsan et al.,<sup>27</sup> but only genes involved in INH and RIF resistance have been further studied.<sup>18,28,29</sup> *M. bovis* isolates are naturally resistant to pyrazinamide due to a single C→G point mutation at nucleotide 169 at the *pncA* gene.<sup>30</sup> In relation to *M. caprae*, only *katG* and *gyrA* have been previously studied for taxonomic purposes.<sup>31</sup>

Microbiological techniques are chosen to test drug susceptibility because not all strains with drug resistance show mutations in these genes. The gold standard susceptibility test is the standard proportion method.<sup>32</sup> The conundrum to the *M. bovis* susceptibility testing is to take into account its growth requirements, which include need of sodium pyruvate when cultured in vitro. However, the ability of certain metabolites, i.e. sodium pyruvate, to neutralize INH activity in mycobacteria has been described.<sup>33–35</sup> Therefore, the aim of this study was to determine the drug susceptibility of *M. bovis* and *M. caprae* isolates of animal origin to isoniazid, rifampin, streptomycin, ethambutol and ofloxacin by sequencing the main genes involved in drug resistance and using the standard proportion method. The effect of sodium pyruvate in the results of the test was also evaluated.

## Materials and methods

### Bacterial isolates

This study was performed in a panel of Spanish *M. bovis* ( $n = 41$ ) and *M. caprae* ( $n = 5$ ) isolates. They have been cultured from tissues with lesions compatible with tuberculosis from different species [cattle ( $n = 32$ ), goat ( $n = 5$ ), pig ( $n = 4$ ), wild boar ( $n = 2$ ), red deer ( $n = 2$ ) and a fox ( $n = 1$ )], collected during a period of 10 years (from 1993 to

2003) and originating from several geographical areas of Spain. They were classified into 36 spoligotyping<sup>36</sup> profiles. Three cattle isolates from the same farm were included because they share the same spoligotyping profile (Hexcode 63-5F-5E-7F-FF-60, SB0426, database [www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)) as the *M. bovis* strain involved in a Spanish MDR human outbreak.<sup>11,37</sup>

### Sequence analysis of the target genes

A loopful of each isolate was resuspended in 200 µl of sterile purified water, heat inactivated, and used as template. Genes involved in resistance to INH, RIF, STR, EMB and OFX were studied. The mycobacterial genomic regions analyzed were catalase-peroxidase (*katG*), enoyl acyl carrier protein reductase (*inhA*), alkylhydroperoxide reductase (*ahpC*), intergenic region *oxyR-ahpC*, RNA polymerase beta (*rpoB*), 16S rRNA (*rrs*), ribosomal protein S12 (*rpsL*), arabinosyl-transferase (*embB*) and DNA gyrase A (*gyrA*). These genes, or fragments of genes, were amplified by PCR with specific primers (Table 1) (Roche Molecular Biochemical, Berlin, Germany) following a standard protocol.<sup>37</sup> The products were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and sequenced in an ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems) (CIB Sequencing Facilities, Madrid, Spain). The sequences were aligned and compared with the software <http://www.ebi.ac.uk/clus-talw/index.html>, taking the *M. bovis* AF2122/97 strain as reference. When a polymorphism was detected, other isolates of the same spoligotyping pattern (when available) were included in the study by sequence analysis of the specific gene.

### Drug susceptibility testing

The susceptibility test of 32 *M. bovis* and three *M. caprae* out of 46 isolates was performed following the standard proportion method<sup>32</sup> in Middlebrook 7H10 agar supplemented with 0.3% of sodium pyruvate (Biomedics, Madrid, Spain) to enhance the growth of *M. bovis* isolates. Antibiotics were added in different concentrations: INH, 0.2 and 1 µg/ml; RIF, 1 µg/ml; STR, 2 and 10 µg/ml; EMB, 5 and 10 µg/ml; and OFX, 2.5 µg/ml. INH susceptibility was also tested in parallel in tubes with and without sodium pyruvate. The tubes were cultured at 37 °C and readings were taken after 3 and 5 weeks. Resistance was defined whenever growth (cfu) on antibiotic-containing tubes exceeded 1% of the growth observed on control medium (drug-free) for INH 0.2 µg/ml, RIF 1 µg/ml, STR 2 µg/ml, EMB 5 µg/ml and OFX 2.5 µg/ml or more than 0.1% for INH 1 µg/ml, STR 10 µg/ml and EMB 10 µg/ml. The batches of media with antibiotic were controlled for activity on *M. tuberculosis* reference strain ATCC27294 (susceptible). Moreover, the susceptibility testing to INH of nine *M. bovis* isolates was also performed by Culture System II [VersaTREK Myco, Cleveland, OH, USA (formerly ESP Culture System, Difco, Detroit, USA)], following the manufacturer's protocol.

**Table 1** Primers selected and/or designed for this study.

Locus	Primer sequences (5' → 3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference	Gene ID*
<i>katG</i>	F1 agctcgtatggcaccggaac	620	60	38	1093267
	R1 ttgacctccaccgacttg				
	F2 ccggtcaagaagaagtacgg	626	60	This study	
	R2 gccgtccttggcgggtgatt				
	F3 gagcaacacccaccattac	653	63	This study	
	R3 cagcgggttctccagatccc				
	F4 ccgagattgccagcctaag	862	60	This study	
	R4 tcagcgcacgtcgaacctgt				
<i>ahpC</i>	F atgccactgctaaccattgg	588	60	This study	1094259
	R ttagccgaagccttgagga				
<i>inhA</i>	F atgacaggactgctggacgg	809	63	This study	1092377
	R tagagcaattgggtgtgctgc				
<i>oxyR-ahpC</i>	F gcttgatgtccgagagcatcg	701	60	39	1094262–1094259
	R ggtcgcgtaggcagtgcccc				
<i>rpoB</i>	F tcgcccgcgtaacaggagt	157	60	22	1091804
	R tgcacgtcgcggacctcca				
<i>rpsL</i>	F ggggtttgtgtgctggaat	830	60	This study	1091822
	R tccccttaacagaaccttg				
<i>rrs</i>	F gtagtcacgcccgtaaacgg	239	60	40	1090640
	R aggccacaagggaacgccta				
<i>embB</i>	F acgctgaaactgctggcgat	339	60	22	1093651
	R acagactggcgtcgtgaca				
<i>gyrA</i>	gyrA1 cagctacatcgactatcgca	319	60	24	1090748
	gyrA2 gggcttcgggtgtacctcat				

\*Accession number of the gene/region in *M. bovis* AF2122/97, GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

## Results

### Sequence analysis

The genes, or the target fragments of genes, involved in drug resistance of 46 *M. tuberculosis* complex (41 *M. bovis* and five *M. caprae*) were sequenced. Five out of eight studied genes showed mutations (Table 2). The *katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB* and *gyrA* genes had single nucleotide polymorphisms. Six substitution mutations were found in 10 *M. bovis* isolates out of 41 (24.4%). None of the replacements found in the studied genes have been described in other resistant or sensitive members of the *M. tuberculosis* complex so far. The *M. caprae* isolates did not have any mutation in the studied genes.

The sequencing analysis of the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes, and the intergenic region *oxyR-ahpC* did not reveal mutations involved in INH-resistance previously described. The analysis of the 46 isolates detected two mutations in the *M. bovis* isolates: three cattle isolates (00/487, 00/491 and 00/583) from the same farm had one non-synonymous polymorphism in the *katG* gene, a Pro533Leu (CCG→CTG) substitution. A fourth cattle isolate (02/1171) had a

Lys181Asn (AAG→AAC) replacement in the *inhA* gene, although other isolates within the panel that share this spoligotyping pattern (Hexcode 6D-5F-5E-7F-FF-60, SB0265) showed the wild type (G). Moreover, all the *M. bovis* and *M. caprae* isolates displayed a CTG (Leu) in codon 463 of *katG*. This polymorphism has been found in INH-resistant *M. tuberculosis* isolates<sup>26</sup> but also as a prevalent allele in the other members of the *M. tuberculosis* complex (*M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*) and *Mycobacterium intracellulare*.<sup>27,41</sup> Our results would confirm codon CTG as the wild type in *M. bovis* and *M. caprae*.

The study of two genes involved in streptomycin resistance (*rrs* and *rpsL*) showed a transition in *rpsL*. One cattle isolate (03/201) had a synonymous polymorphism at codon 23 [GCT→GCG (Ala→Ala)]. We sequenced four other isolates with the same profile (Hexcode 6F-5F-5B-7F-EF-60, SB0886), from three different farms. All of them showed the same replacement. Three cattle isolates of the panel with the same spoligotyping pattern (Hexcode 40-00-00-7F-FF-60, SB0152) and from different farms had a mutation at position 87 (A→G) in the intergenic region between the *Mb0700-rpsL*. We sequenced five additional isolates with

**Table 2** Single nucleotide polymorphisms in genes associated to drug resistance found in the Spanish panel of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates of animal origin.

Isolates	Geographic origin <sup>a</sup>	Host	Sporigotype	Gene/nucleotide position (codon)					
				katG <sup>1</sup> 1598 (533)	inhA 543 (181)	rpsL 68 (23)	Mb0700-rpsL Intergenic region position 87	embB 945 (315)	gyrA 334 (112)
AF2122/97 <sup>2</sup>	–	–	SB0140	CCG (Pro)	AAG (Lys)	GCT (Ala)	A	TAC (Tyr)	GGC (Gly)
00/487 <sup>3</sup>	Castilla-La	Cattle	SB0426	CTG (Leu)	–	–	–	–	–
00/491	Mancha	Cattle	–	CTG (Leu)	–	–	–	–	–
00/583	–	Cattle	–	CTG (Leu)	–	–	–	–	–
02/1171	Cantabria	Cattle	SB0265	–	AAC (Asn)	–	–	–	–
00/502	Extremadura	Pig	–	–	AAG (Lys)	–	–	–	–
00/640	Castilla-La	Pig	–	–	AAG (Lys)	–	–	–	–
03/550	Mancha	–	–	–	–	–	–	–	–
03/201	Asturias	Cattle	–	–	AAG (Lys)	–	–	–	–
Additional isolates (n = 4)	Cantabria	Cattle	SB0886	–	–	GCG (Ala)	–	–	–
	Castilla y León,	Cattle	–	nd	nd	GCG (Ala)	nd	nd	nd
	Cantabria	–	–	–	–	–	–	–	–
02/646	Extremadura	Cattle	SB0152	–	–	–	G	–	–
02/685	Castilla y León	Cattle	–	–	–	–	G	–	–
03/266	Asturias	Cattle	–	–	–	–	G	–	–
Additional isolates (n = 5)	Castilla-La	Cattle	–	nd	nd	nd	G	nd	nd
	Mancha,	–	–	–	–	–	–	–	–
	Cantabria,	–	–	–	–	–	–	–	–
	Castilla y León	–	–	–	–	–	–	–	–
03/556	Asturias	Cattle	SB0329	–	–	–	–	TAT (Tyr)	–
Additional isolates (n = 6)	Asturias Castilla y León, Madrid	Cattle	–	nd	nd	nd	nd	TAT (Tyr) <sup>4</sup>	nd
	–	–	–	–	–	–	–	TAC (Tyr)	–
03/526	Cantabria	Cattle	SB1231	–	–	–	–	–	AGC (Ser)
Others <sup>5</sup>	Several geographic origin	Cattle	30 sporigotypes	–	–	–	–	–	–
	–	Pig	–	–	–	–	–	–	–
	–	Wild boar	–	–	–	–	–	–	–
	–	Red deer	–	–	–	–	–	–	–
	–	Fox	–	–	–	–	–	–	–
	–	Goat	–	–	–	–	–	–	–

The nucleotide substitutions are marked in bold.

–: Same nucleotide as reference strain *M. bovis* AF2122/97 at that position.

nd: genes not determined in these isolates.

<sup>a</sup>Geographic origin in Spain: Asturias and Cantabria (north), Castilla-La Mancha (central-south), Castilla y León (central-north), Extremadura (central-west), Madrid (central).

<sup>2</sup>All the *M. bovis* and *M. caprae* isolates showed a CTG in codon 463.

<sup>3</sup>Sequences downloaded from GenBank database site.

<sup>4</sup>Three *M. bovis* isolates from the same farm.

<sup>5</sup>Two isolates displayed the polymorphism (TAT) and four the wild type (TAC).

<sup>6</sup>Other 28 *M. bovis* and five *M. caprae* isolated from distinct animals, several geographical areas and with different sporigotypes.



this pattern from different geographical origin, and all showed the same replacement.

The sequence analysis of the *embB* gene involved in ethambutol resistance revealed a synonymous substitution in *embB* at codon 315 (TAC→TAT, Tyr→Tyr) in a cattle isolate (03/556). Six other *M. bovis* isolates with the same profile (Hexcode 6F-5F-5E-7F-FF-00, SB0329) obtained from different farms were sequenced and two had the nucleotide change (T), both from northern Spain like the first one. The remaining isolates showed the wild type (C), all of them isolated in Central Spain.

The *gyrA* gene involved in quinolone resistance, showed a non-synonymous polymorphism in a cattle isolate (03/526) at position 334, resulting in Gly112Ser (GGC→AGC) replacement. This is the only isolate with this spoligotype in our culture collection.

### Drug susceptibility testing

The susceptibility test of 35 isolates (including all *M. bovis* isolates with nucleotide substitutions) was evaluated by the standard proportion method. The isoniazid susceptibility testing in Middlebrook medium with sodium pyruvate showed that 33 isolates out of 35 (94.3%) grew at concentration of 0.2 µg INH/ml. Furthermore, 24 (68.6%) grew also at 1 µg INH/ml (Table 3). The growth of the 35 isolates was good in the control tubes. Unlike the appropriate growth obtained in the culture media with pyruvate, 12 isolates out of 35 (34.3%) failed to grow in the 7H10 control tubes without pyruvate, at least during the 5 weeks (Table 3). Moreover, the growth of the remaining isolates (65.7%) was poorer and slower than in the tubes with pyruvate, thus making difficult the interpretation of results. All the isolates that were successfully tested in the last medium (65.7%) were sensitive to INH. Six of the *M. bovis* isolates that did not grow without pyruvate and three well-grown isolates were tested to INH susceptibility by Culture System II. All nine isolates were sensitive to INH.

The results also showed that the panel of isolates were susceptible to RIF, STR, EMB and OFX.

### Discussion

The monitoring of drug susceptibility of *M. tuberculosis* complex isolates is important to ensure the implementation of the most appropriate therapy to patients. Although *M. bovis* has been associated to veterinary environment and person-to-person transmission seemed to be unusual, it has been recently described that the human cases of *M. bovis*

tuberculosis can behave like *M. tuberculosis* infection in the human population.<sup>10</sup> In spite of the fact that *M. bovis* and *M. caprae* infect humans, limited information about drug testing of both species is available, and to our knowledge, this is the first report regarding drug susceptibility of *M. caprae*.

We tested the susceptibility of *M. bovis* and *M. caprae* isolates to five anti-tuberculous drugs commonly used for the therapy against tuberculosis in humans, including those of first-line treatment. All the Spanish isolates in this study that were successfully tested were sensitive to INH, RIF, STR, EMB and OFX by the proportion method. These results would be in accordance with the ban of treatment of livestock as slaughter of animals that react positive to diagnostic test in the eradication campaigns is compulsory. The 29 *M. bovis* and *M. caprae* isolates from animal origin that were successfully tested (23 by the proportion method plus six by ESP Culture System II) were fully INH-sensitive. The lack of resistances in the Spanish isolates from animal origin are in agreement with sensitivity of *M. bovis* isolates to INH and RIF in United Kingdom,<sup>13</sup> to INH, RIF, STR and EMB in Brazil<sup>20</sup> and INH, RIF, STR, EMB and quinolones in the United States.<sup>21</sup> However, they are in contrast to high percentages of resistance found in Italy to INH and RIF.<sup>18,19</sup>

The results obtained by the standard proportion method in Middlebrook medium reassert that pyruvate affects the interpretation of the INH susceptibility testing that had been described when testing other species of the genus *Mycobacterium*.<sup>33-35</sup> Moreover, the results reaffirm that sodium pyruvate is required for optimal growth of the majority of *M. bovis* isolates, as it was essential for the 34.2% of the isolates of this zoonotic pathogen and improved the growth of the remaining. Therefore, the use of the gold standard susceptibility method to assess the *M. bovis* susceptibility to INH is called into question. We suggest the use of the alternative liquid culture systems (ESP Culture System II) to assess the *M. bovis* susceptibility to INH since six of the isolates, that failed to grow in 7H10 medium without pyruvate, were successfully tested.

The sequence analysis showed that some Spanish isolates presented single mutations in the *katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB* and *gyrA* genes. These changes were not previously described in other resistant or sensitive members of the *M. tuberculosis* complex. Considering the results obtained by the microbiological technique, we state that the single nucleotide polymorphisms detected in the *M. bovis* isolates seem not to be involved in resistance. Because of the slow growth of mycobacteria and difficulties associated to the sensitivity tests, the current trend is the development of molecular approaches for fast detection of resistances.

**Table 3** Growth of 35 isolates (32 *Mycobacterium bovis* and three *M. caprae*) in Middlebrook (M) media with or without pyruvate by the standard proportion method at different concentration of INH.

Culture media	Growth control	INH	
		0.2 µg/ml	1.0 µg/ml
M with pyruvate (3 mg/ml)	35/35 (100%)	33/35 (94.3%)	24/35 (68.6%)
M without pyruvate	23/35 (65.7%)	0	0

However, these polymorphisms should be confirmed by microbiological tests.

The polymorphisms could also be useful to determine or dismiss epidemiological links among isolates. The combined use of the molecular techniques allowed us to detect the same single nucleotide substitutions in isolates sharing the spoligotyping pattern, such as the silent mutation GCT→GCG in the *rpsL* gene and the SB0886 profile. These would strongly indicate that the single nucleotide polymorphisms would be conserved and that this strain would be responsible (clonal dissemination) of these bovine outbreaks. On the other hand, the available information about the sequence of the *katG*<sup>29</sup> and *rpoB* genes<sup>28</sup> from the MDR *M. bovis* isolates involved in the Spanish outbreak rule out a direct epidemiological link between the human isolates and the *M. bovis* displaying the same spoligotyping pattern (SB0426). The Pro533Leu substitution in *katG* of the cattle isolates was not present in the MDR isolates,<sup>29</sup> and the Ser531Leu in *rpoB* of the MDR isolates<sup>28</sup> was not found in the isolates of animal origin. This fact corroborates the results obtained with Variable Number Tandem Repeat analysis.<sup>37</sup>

These preliminary results would indicate that the Spanish *M. bovis* and *M. caprae* of animal origin are not the likely source of drug-resistant human cases. Therefore, the development of drug-resistant *M. bovis* would be caused in the human reservoir because of inadequate therapy. In case of tuberculosis due to *M. bovis*, which is naturally resistant to pyrazinamide, the unique INH and RIF treatment would favor the appearance of resistances. Therefore, the proper identification of the species that cause the disease should be taken into account.

In conclusion, due to the risk of *M. bovis* and *M. caprae* transmission from animals to humans and among human beings, the surveillance system is necessary to control the susceptibility of these species. All the *M. bovis* and *M. caprae* isolates successfully tested were sensitive to the anti-tuberculosis drugs. However, the *M. bovis* susceptibility to INH cannot be reliably determined using the standard proportion method due to the *M. bovis* growth requirements and the interference of pyruvate with INH. Microbiology and molecular techniques complement each other in the study of the drug-resistance and epidemiology.

### Acknowledgments

We would like to thank L. Carbajo, J.L. Paramio and J.L. Sáez-Llorente, J. Carpintero and R. Díaz for their continuous encouragement.

We thank the staff of the SADNA (C.I.B. Madrid) for sequencing. We appreciate the technical help of F. Lozano and N. Moya. We are grateful to M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by project AGL2001-2029 and AGL2004-08092 of the Spanish Ministry of Science and Technology, and by the Spanish Ministry of Agriculture Fisheries and Food. B. Romero is recipient of a research contract funded by Comunidad de Madrid (IV regional framework programme of research and technological innovation 2005–2008). The group is a partner of the

coordination action "Veterinary European Network on Mycobacteria (VENoMYC)" funded by the European Union.

**Competing interests:** None declared

**Ethical approval:** Not required

### References

1. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 2000;105:1–5.
2. Grange JM, editor. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinburg)* 2001;81:71–7.
3. Blaas SH, Bohm S, Martin G, et al. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:431–3.
4. Meyer S, Naumann L, Landthaler M, Vogt T. Lupus vulgaris caused by *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae*. *Br J Dermatol* 2005;153:220–2.
5. Rua-Domenech R, editor. *Human Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburg)* 2006;86:77–109.
6. Thoen C, LoBue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006;112:339–45.
7. LoBue PA, Moser KS. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994–2003. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:333–8.
8. Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:11–37.
9. Winters A, Driver C, Macaraig M, et al. Tuberculosis cases caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001–2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54:605–8.
10. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007;369:1270–6.
11. Guerrero A, Cobo J, Fortún J, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 1997;350:1738–42.
12. Nitta AT, Knowles LS, Kim J, et al. Limited transmission of multidrug-resistant tuberculosis despite a high proportion of infectious cases in Los Angeles County, California. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:812–7.
13. Hughes VM, Skuce R, Doig C, Stevenson K, Sharp JM, Watt B. Analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* from three clinical samples from Scotland. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:1191–8.
14. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 2003;41:3070–7.
15. Erler W, Martin G, Sachse K, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J Clin Microbiol* 2004;42:2234–8.
16. Gutiérrez M, Samper S, Jiménez MS, van Embden JD, Marin JF, Martín C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:3328–30.

17. Proding WM, Eigentler A, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002;40:2270-2.
18. Sechi LA, Zanetti S, Sanguinetti M, et al. Molecular basis of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1645-8.
19. Cavirani S, Fanti F, Benecchi M, et al. Evaluation of susceptibility of *Mycobacterium bovis* to antituberculous drugs by radiometric BACTEC 460TB system. *New Microbiol* 2003;26:181-6.
20. Parreiras PM, Lobato FC, Alencar AP, et al. Drug susceptibility of Brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using traditional and molecular techniques. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:749-52.
21. Daly M, Diegel KL, Fitzgerald SD, Schooley A, Berry DE, Kaneene JB. Patterns of antimicrobial susceptibility in Michigan wildlife and bovine isolates of *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 2006;18:401-4.
22. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
23. Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:238-42.
24. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773-80.
25. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997;3:567-70.
26. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1241-50.
27. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9869-74.
28. Blázquez J, Espinosa de los Monteros LE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:1390-3.
29. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, et al. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 2005;43:1220-7.
30. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996;2:662-7.
31. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1785-9.
32. Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacterial drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 1963;27:217-72.
33. Garattini S, Leonardi A. Mechanism of action of isoniazid: relations with the pyruvic acid of the mycobacterial. *G Ital Chemioter* 1954;1:281-8.
34. Pope H. The neutralization of isoniazid activity in *Mycobacterium tuberculosis* by certain metabolites. *Am Rev Tuberc* 1955;73:735-47.
35. Boisvert H. Effect of pyruvic acid on mycobacterial growth and antibiograms. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 1970;34:117-24.
36. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
37. Romero B, Aranaz A, de Juan L, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol* 2006;44:3405-8.
38. Uhl JR, Sandhu GS, Kline BC, Cockerill FR. PCR-RFLP Point of mutations in catalase-peroxidase gene (*katG*) of *Mycobacterium tuberculosis* associated with isoniazid resistance. In: Persing DH, editor. *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1996. p. 144-9.
39. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Deretic V, Musser JM. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:600-6.
40. Kempell KE, Ji YE, Estrada IC, Colston MJ, Cox RA. The nucleotide sequence of the promoter, 16S rRNA and spacer region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA. *J Gen Microbiol* 1992;138:1717-27.
41. van Doorn HR, Kuijper EJ, van der EA, et al. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J Clin Microbiol* 2001;39:1591-4.



## Single-Nucleotide Polymorphism in Two Representative Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Isolates Collected from Patients in a Spanish Hospital Harboring a Human Infection Outbreak<sup>†</sup>

*Mycobacterium bovis* is the etiological agent of tuberculosis in domestic and wild animals. Its involvement as a human pathogen has been highlighted again with the recent descriptions of transmission through dairy products (18), reactivation or primary infection in human immunodeficiency virus-infected patients (5), and association with meat industry workers, animal keepers, or hunters (3). Strains resistant to antituberculous drugs (*M. bovis* is naturally resistant to pyrazinamide) pose an additional risk (2). Several studies have demonstrated that mutations in target genes are associated with resistance to antituberculous drugs (4, 7, 10, 11, 16). However, most of them have been developed in *Mycobacterium tuberculosis* strains and limited data are available regarding *M. bovis* isolates.

The aim of this study was to characterize by sequencing the main genes involved in antibiotic resistance in two multidrug-resistant (MDR) *M. bovis* isolates in a human outbreak detected in a hospital in Madrid that subsequently spread to several countries (5, 6, 15). The isolates were resistant to 11 drugs, but only their *rpoB* and *katG* genes have been analyzed so far (1, 14). We studied the first (93/R1) and last (95/R4) *M. bovis* isolates of this nosocomial outbreak, characterized by spoligotyping as SB0426 (hexacode 63-5F-5E-7F-FF-60) in the database at [www.mbovis.org](http://www.mbovis.org) (1, 13).

Several genes involved in resistance to isoniazid (*katG*, *ahpC*, *inhA*, and the *oxyR-ahpC* intergenic region), rifampin (*rpoB*), streptomycin (*rpsL*), ethambutol (*embB*), and quinolones (*gyrA*) were studied. These genes, or fragments of genes, were amplified and sequenced as previously described (12).

The sequence analysis revealed polymorphisms in five (*ahpC*, *rpoB*, *rpsL*, *embB*, and *gyrA*) out of nine analyzed genes (Table 1). Nucleotide substitutions in four genes cause a change in the encoded amino acid. Two additional synonymous mutations in *ahpC* and *rpsL* differentiated the first and last isolates from the outbreak.

The analysis of the main genes involved in isoniazid resistance did not show polymorphism involved in resistance. Both *M. bovis* isolates displayed a CTG codon at position 463 of the *katG* gene. It was initially hypothesized that this Arg463Leu

change might be involved in resistance to isoniazid according to reports on *M. tuberculosis* isolates (9), but it was shown later that they are not associated (17). Sequencing of the *ahpC* gene showed that the last MDR isolate from the outbreak (95/R4) had a silent mutation at codon 70 (AAG→AAA, Lys→Lys).

The sequencing of the *rpoB* gene revealed a substitution mutation in codon 531 (TCG→TTG, Ser→Leu) in the two human MDR isolates (1, 14). Greater than 95% of the rifampin-resistant *M. tuberculosis* complex strains have mutations between codons 507 and 533 of the *rpoB* gene (8).

The study of two genes involved in streptomycin resistance showed no polymorphisms in *rps* and two mutations in *rpsL*. Both human isolates had a substitution mutation with a replacement in codon 43 (AAG→AGG, Lys→Arg) that has been found in *M. tuberculosis* isolates with resistance to this drug, predominantly associated with a high-level resistance phenotype (7). Also, the last MDR isolate (95/R4) accumulated a silent mutation at codon 38 (TAC→TAT, Tyr→Tyr) that has not been described. In relation to ethambutol resistance, both human isolates also showed a mutation located at codon 306 (ATG→GTG, Met→Val) in the *embB* gene. This mutation has been described in *M. tuberculosis* isolates (10), but it has not been reported in *M. bovis* so far. The *gyrA* gene showed a nucleotide replacement at codon 91 (TCG→CCG, Ser→Pro), which has been described in resistant *M. tuberculosis* strains (4), that was associated with resistance to fluoroquinolones.

In summary, the MDR *M. bovis* isolates harbored nucleotide substitutions in the *rpoB*, *rpsL*, *embB*, and *gyrA* genes previously described in *M. tuberculosis* strains but the genetic mechanism of isoniazid resistance remains unknown. Knowledge of frequent mutations would help in the development of precise molecular tests to quickly detect resistance. However, more studies of the mutations underlying drug resistance in *M. bovis* strains are needed before reliable use of the rapid commercial systems available for the detection of gene mutations is possible.

This research was funded by project AGL 2001-2029 of the Spanish Ministry of Science and Technology and by the Spanish Ministry of Agriculture Fisheries and Food. B. Romero is the recipient of a research contract funded by Comunidad de Madrid (IV Regional Framework Program of Research and Technological Innovation 2005-2008).

We thank the staff of the SADNA (C.I.B. Madrid) for sequencing. We are grateful to M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

### REFERENCES

- Blázquez, J., L. E. Espinosa de los Monteros, S. Samper, C. Martín, A. Guerrero, J. Cobo, J. van Embden, F. Baquero, and E. Gómez-Mampaso. 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol.* 35:1390–1393.
- Dankner, W. M., N. J. Waecker, M. A. Essey, K. Moser, M. Thompson, and C. E. Davis. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine* 72:11–37.
- de la Rua-Domenech, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86:77–109.

TABLE 1. Mutations in genes associated to drug resistance found in the first (93/R1) and last (95/R4) human MDR *M. bovis* isolates

Gene	Nucleotide position	Codon no.	AF2122/97 <sup>a</sup>	93/R1 <sup>b</sup>	95/R4 <sup>b</sup>
<i>ahpC</i>	210	Lys 70 Lys	AAG	AAG	AAA
<i>rpoB</i>	1367	Ser 531 Leu	TCG	TTG <sup>c</sup>	TTG <sup>c</sup>
<i>rpsL</i>	114	Tyr 38 Tyr	TAC	TAC	TAT
<i>rpsL</i>	128	Lys 43 Arg	AAG	AGG	AGG
<i>embB</i>	916	Met 306 Val	ATG	GTG	GTG
<i>gyrA</i>	271	Ser 91 Pro	TCG	CCG	CCG

<sup>a</sup> The sequences were compared with the application software at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> by using the *M. bovis* AF2122/97 strain as a reference (GenBank accession no. BX248333).

<sup>b</sup> Nucleotide substitutions involved in drug resistance are in bold.

<sup>c</sup> The results for the *rpoB* sequence of MDR isolates were described previously (1).



4. Giannoni, F., E. Iona, F. Sementilli, L. Brunori, M. Pardini, G. B. Migliori, G. Orefici, and L. Fattorini. 2005. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2928–2933.
5. Guerrero, A., J. Cobo, J. Fortún, E. Navas, C. Quereda, A. Asensio, J. Cañón, J. Blázquez, and E. Gómez-Mampaso. 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 350:1738–1742.
6. Long, R., E. Nobert, S. Chomyc, J. van Embden, C. McNamee, R. R. Duran, J. Talbot, and A. Fanning. 1999. Transcontinental spread of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:2014–2017.
7. Meier, A., P. Sander, K. J. Schaper, M. Scholz, and E. C. Bottger. 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2452–2454.
8. Morgan, M., S. Kalantri, L. Flores, and M. Pai. 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 5:62.
9. Musser, J. M., V. Kapur, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth, D. van Soolingen, and J. D. van Embden. 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J. Infect. Dis.* 173:196–202.
10. Parsons, L. M., M. Salfinger, A. Clodbridge, J. Dormandy, L. Mirabello, V. L. Polletta, A. Sanic, O. Sinyavskiy, S. C. Larsen, J. Driscoll, G. Zickas, and H. W. Taber. 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2218–2225.
11. Ramaswamy, S. V., R. Reich, S. J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, and E. A. Graviss. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1241–1250.
12. Romero, B., A. Aranaz, J. Bezoz, J. Álvarez, L. de Juan, M. T. Javed, A. Mateos, E. Gómez-Mampaso, and L. Domínguez. 2007. Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals. *Tuberculosis* 87:565–571.
13. Romero, B., A. Aranaz, L. de Juan, J. Álvarez, J. Bezoz, A. Mateos, E. Gómez-Mampaso, and L. Domínguez. 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J. Clin. Microbiol.* 44:3405–3408.
14. Samper, S., M. J. Iglesias, M. J. Rabanaque, L. I. Gómez, M. C. Lafoz, M. S. Jiménez, A. Ortega, M. A. Lezcano, D. van Soolingen, and C. Martín. 2005. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J. Clin. Microbiol.* 43:1220–1227.
15. Samper, S., C. Martín, A. Pinedo, A. Rivero, J. Blázquez, F. Baquero, D. van Soolingen, and J. van Embden. 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 11:1237–1242.
16. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341:647–650.
17. van Doorn, H. R., E. J. Kuijper, A. van der Ende, A. G. A. Welten, D. van Soolingen, P. E. W. de Haas, and J. Dankert. 2001. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J. Clin. Microbiol.* 39:1591–1594.
18. Winter, A., C. Driver, M. Macraig, C. Clark, S. S. Munsiff, C. Pichardo, J. Jereb, P. LoBue, and M. Lynch. 2005. Tuberculosis cases caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001–2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54:605–608.

Beatriz Romero  
 Alicia Aranaz\*  
 Javier Bezoz  
 Julio Álvarez  
 Lucía de Juan  
 Ana Mateos  
 Departamento de Sanidad Animal  
 Facultad de Veterinaria  
 Universidad Complutense de Madrid  
 28040 Madrid, Spain

Enrique Gómez-Mampaso  
 Servicio de Microbiología  
 Hospital Ramón y Cajal  
 IMSALUD  
 28034 Madrid, Spain

Lucas Domínguez  
 Departamento de Sanidad Animal  
 Facultad de Veterinaria  
 Universidad Complutense de Madrid  
 28040 Madrid, Spain

\*Phone: 34 91 3943721  
 Fax: 34 91 3943795  
 E-mail: alaranaz@vet.ucm.es

† Published ahead of print on 19 December 2007.

## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La presente memoria doctoral recoge varias investigaciones epidemiológicas con el fin de clarificar algunos aspectos poco estudiados relacionados con la tuberculosis bovina, producida por aislados del complejo *M. tuberculosis* en nuestro país. Debido a que la erradicación de la tuberculosis bovina es uno de los objetivos principales de las autoridades sanitarias a nivel global y en especial en el ámbito europeo, durante los últimos años se han producido avances en las técnicas de diagnóstico y en las técnicas de caracterización molecular. Estas herramientas moleculares han sido la base para la realización de estudios epidemiológicos en esta tesis doctoral, junto con otras técnicas más tradicionales como son el análisis microbiológico para la confirmación de la infección y la determinación de la sensibilidad antibiótica de los aislados.

Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina en el ganado vacuno han conseguido una reducción de la prevalencia de la infección en España. En lo que respecta a la especie *M. bovis*, principal agente causal de la tuberculosis bovina, hay que destacar su capacidad para infectar un amplio rango de hospedadores incluyendo animales domésticos, salvajes, primates no humanos y humanos. La presencia de esta infección en animales de vida libre trajo consigo la hipótesis de que todas ellas pudieran actuar como potenciales reservorios de la enfermedad. Por ello, la implicación de los animales salvajes en la epidemiología de esta infección ha cobrado importancia en la última década, ya que la presencia de la tuberculosis en las poblaciones de vida libre podría interferir en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, presentar un problema en el manejo de los animales salvajes y a nivel de Salud Pública.

Dado que se ha descrito que la tuberculosis está también presente en especies no domésticas, realizamos un muestreo en animales de vida libre y en ganado bovino en el Parque Nacional de Doñana, uno de los espacios protegidos más importantes del territorio español y una de las mayores reservas ecológicas de Europa, con el fin de conocer la prevalencia de esta infección. En el estudio se tomaron muestras del ganado vacuno (N=678) y de varias especies salvajes, tales como ciervo, gamo, jabalí, zorro y lince (N=531), durante los años 1998-2003, y mediante cultivo microbiológico se confirmó la infección tuberculosa producida por *M. bovis* en los animales domésticos y salvajes. La prevalencia de la infección en el ganado bovino en el momento del estudio fue elevada (7,96%) y muy superior a prevalencia en España en el último año de muestreo (2,14%), aunque estaba muy próxima a la observada en el año 2003 en la Junta de Andalucía (8,47%). Del mismo modo se evaluó la infección en la población de animales salvajes, observando una prevalencia de tuberculosis bovina del 20,53% (15,48% en ciervos, 12,69% en gamos y 28,04% en jabalíes). En España, algunos estudios previos han determinado la infección en cinco especies de animales salvajes, aislándose *M. bovis* en el 48,3% de los 323 animales muestreados de todas las especies animales (Aranaz *et al.*, 2004). Con base en la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis, la prevalencia media de esta infección en jabalíes y ciervos en otros estudios ha sido del 42% y del 13%, respectivamente (Vicente *et al.*, 2006), aunque en ciertas áreas del centro-sur de la Península Ibérica se ha detectado la infección hasta en el 100% de jabalíes y el 50% de ciervos (Vicente *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2007). Por el contrario, en un estudio realizado entre los años 1992 y 2004 en Extremadura, la infección en jabalíes se situó en el 3,92% y en ciervos en el 1,09% (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006). En este último caso, la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis en animales salvajes se relacionó de forma directa con el aumento de la prevalencia de la tuberculosis bovina en las vacas. La implicación del jabalí, como especie reservorio de la tuberculosis bovina se ha puesto de manifiesto gracias al mantenimiento de la infección en espacios vallados sin contacto alguno con el ganado bovino durante décadas (Gortázar *et al.*, 2005). Concretamente, en el Parque Nacional de Doñana se introdujo ganado bovino con un manejo extensivo en la década de los años 90, con el fin de hacer un mejor uso de los recursos de la zona. Aunque en este estudio no se incluyen muestras de animales salvajes anteriores a 1998, la información derivada de las necropsias de campo en los animales de vida libre no reveló lesiones compatibles con tuberculosis (C. Sánchez, datos no publicados). Por lo tanto, es posible que el ganado infectado con tuberculosis bovina introdujera la infección en la población salvaje por una falta de sensibilidad en las técnicas diagnósticas de las campañas de erradicación. Los estudios realizados en el Parque Nacional Kruger en África mostraron una prevalencia de la tuberculosis bovina en el búfalo de hasta el 90% al sur del parque, destacando que está rodeado en su mayoría por pastos comunales de ganado bovino. La transmisión de esta especie a los animales salvajes también ha sido descrita, incluyendo especies depredadoras, herbívoros y omnívoros (Bengis *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2006).

Además de la importancia que tienen los animales salvajes en los programas de control de la tuberculosis en el ganado bovino, hay que sumarle el riesgo que supone esta infección en la supervivencia de algunas especies en peligro de extinción, como el lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Briones *et al.*, 2000). Este felino endémico de la

Península Ibérica es el único incluido en la lista roja de especies amenazadas elaborada por la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza, y está clasificado como especie en peligro crítico de extinción. La problemática asociada a la situación de extinción de esta especie ha sido la reducción de la población de conejos, la fragmentación de su área de distribución y la mortalidad inducida por el hombre (atropellos, envenenamiento, cepos, etc.). A estos factores hay que sumarle la infección tuberculosa que ha sido confirmada en varios estudios previos llevados a cabo en el Parque Nacional de Doñana (Briones *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001b; Aranaz *et al.*, 2004; Martín-Atance *et al.*, 2006). Debido a la escasez de su principal fuente de alimentación, el conejo, el linco también consume anátidas y pequeños ungulados, entre otras presas. Dada la elevada prevalencia de la tuberculosis bovina en los ungulados salvajes de este área de estudio es muy probable que su fuente de contagio haya sido el contacto directo con carcasas infectadas, principalmente de gamos. Por lo tanto, la tasa de infección en los ungulados de vida libre puede afectar a la supervivencia del linco en España, siendo recomendado el control de la misma en la cadena trófica de esta especie. Del mismo modo que el linco está afectado por la tuberculosis debido a sus fuentes de alimentación, otras especies carnívoras sufren los mismos efectos a nivel mundial. La infección por las especies del complejo *M. tuberculosis* ha sido descrita en otros animales carnívoros como el león (*Panthera leo*) y el guepardo (*Acionyx jubatus*) en África (de Vos *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2006), o el coyote (*Canis latrans*), el mapache (*Procyon lotor*), el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y el gato montés (*Felix rufus*) en Estados Unidos (Bruning-Fann *et al.*, 2001), entre otros. En África, la principal fuente de alimentación para el león y el guepardo es el búfalo, que tiene una alta tasa de infección (Michel *et al.*, 2009); una situación similar ocurre en Estados Unidos, donde la tuberculosis es endémica en la población del ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Bruning-Fann *et al.*, 2001).

En la actualidad, la confirmación de la presencia de la infección tuberculosa en animales domésticos y salvajes es sólo el primer paso en el estudio de esta enfermedad, y es imprescindible la realización de estudios epidemiológicos. Estos estudios deben incluir siempre una base tradicional como son las encuestas epidemiológicas, la observación de lesiones macroscópicas o el comportamiento y los hábitos de las distintas especies animales; y además, deben incluir estudios avanzados de caracterización molecular de los aislados. En este aspecto, la epidemiología molecular es una herramienta indispensable y tiene un papel fundamental para la investigación de los brotes de tuberculosis bovina, ya que identifica de forma inequívoca los aislados que están causando la enfermedad. Gracias al genotipado de los aislados, la información generada permite el estudio de las inter-relaciones entre los animales de una misma explotación, entre los animales domésticos y salvajes, entre las diversas especies de animales de vida libre, y entre los animales y el hombre. El espoligotipado ofrece una buena discriminación en países como Francia, Portugal, Italia o España, pero no es la técnica de elección en las islas británicas debido a su bajo potencial de distinción entre los aislados (Skuce *et al.*, 2005; Veterinary Laboratories Agency, 2005). El análisis de los marcadores MIRU-VNTR (MLVA) se está convirtiendo en una técnica de caracterización molecular complementaria para los aislados del complejo *M. tuberculosis*, sobre todo en aquellos países donde la discriminación del espoligotipo es insuficiente para establecer relaciones entre los brotes. Por lo tanto, ambas técnicas son las

herramientas moleculares más utilizadas para la diferenciación a nivel genómico de los aislados y para estudiar de forma detallada la epidemiología de esta infección.

En los trabajos que componen esta tesis se ha hecho hincapié en la utilización de estas dos técnicas para establecer posibles relaciones entre distintos brotes de tuberculosis bovina. En el estudio realizado en el Parque Nacional de Doñana durante un periodo de seis años (1998-2003) el espigotipado reveló la presencia de un total de nueve perfiles distintos: cinco perfiles fueron únicamente aislados de animales domésticos (SB0120, SB0134, SB0822, SB1233, y SB1234), otro perfil aislado de un lince (SB0295), que procedía de la zona de Sierra Morena, y tres perfiles aislados tanto de animales domésticos como salvajes (SB1232, SB1230 y SB0950), siendo SB1232 y SB1230 los espigotipos más frecuentes en la zona (77,30% y 15,34%, respectivamente). La diversidad de espigotipos en este área es similar a la encontrada en España, aunque el poder de discriminación ( $h=0,38$ ) es muy inferior al asignado a nivel nacional ( $h=0,86$ ) (Rodríguez *et al.*, 2010). Durante el estudio el perfil más frecuente, SB1232, no había sido descrito en otros países y el espigotipo SB1230 estaba restringido a la Península Ibérica (Aranaz *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008). En España, ambos perfiles están restringidos a este área geográfica. Debido a la escasa discriminación que ofrecía la caracterización del locus DR se realizó un análisis de ocho loci MIRU-VNTR en una selección de 92 aislados que incluía todos los espigotipos identificados en el Parque Nacional de Doñana. El número de perfiles generados por esta técnica y la discriminación ofrecida por estos loci fue similar al del espigotipado aunque se observaron diferencias en el comportamiento de cada locus: los perfiles alélicos obtenidos mediante la combinación de los loci QUB3232 (VNTR3232) y ETR-A (VNTR2165) solapaban con los principales grupos definidos por el espigotipado; mientras que la combinación con otros loci con una menor diversidad alélica permitió la obtención de una discriminación mayor. Con base en estos resultados podemos decir que la combinación del espigotipado y el análisis de los loci MIRU-VNTR confirman que los animales salvajes, tanto los artiodáctilos (ciervo, gamo, jabalí) como los carnívoros (zorro y lince), están infectados con las cepas de *M. bovis* que son más prevalentes en el ganado bovino. Sin embargo, estos hallazgos no determinan la dirección ni la frecuencia de la transmisión entre el ganado bovino y los animales de vida libre, ni tampoco si ocurre o ha ocurrido de forma frecuente u ocasional, con la consiguiente transmisión entre los animales salvajes. El hecho de introducir animales domésticos en áreas con animales salvajes presenta un gran riesgo para las poblaciones de vida libre cuando no es posible garantizar la ausencia de la infección y no se aplican las técnicas de diagnóstico ni las medidas de control adecuadas. A diferencia de la mayoría de los cotos de caza, en el Parque Nacional de Doñana no se aplica ninguna medida de manejo sobre los animales de vida libre, por ejemplo el suplemento alimenticio en los meses estivales; aunque los animales domésticos y salvajes compartían los pastos y las fuentes de agua durante el muestreo realizado. Por lo tanto, los comederos de los animales domésticos, así como las charcas o fuentes de agua, se consideran los factores de riesgo en la transmisión. Existen otros ejemplos distribuidos por todo el mundo, como por ejemplo la transmisión de la tuberculosis del ganado bovino al búfalo (*Syncerus caffer*) en África y de éstos a otras especies salvajes en el Parque Nacional Kruger (Michel *et al.*, 2006). También se puede aplicar este hecho a otras enfermedades

infecciosas, como la brucelosis en el Parque Nacional de Yellowstone (Dobson y Meagher, 1996).

El análisis de los resultados obtenidos mediante MIRU-VNTR también ha permitido la identificación de infecciones mixtas en un mismo animal. Éste ha sido el caso de un jabalí y de una vaca del estudio. Ambos animales compartían el mismo perfil de espoligo (SB0950). Al realizar la caracterización de ambos aislados mediante MLVA se observaron dos variantes alélicas en seis de los ocho marcadores utilizados. El perfil MIRU-VNTR se correspondía con la suma de las variantes alélicas obtenidas con los espoligotipos SB01232 y SB01230, reconociendo dos cepas. La superposición de ambos perfiles fue caracterizado como el perfil SB0950, aunque este perfil no existía en realidad en este área. Hasta el momento de la descripción de este estudio, ésta es la primera descripción de coinfección por *M. bovis* en animales. La infección doble en humanos también es un evento raro y está asociada a una alta exposición al agente etiológico (García de Viedma *et al.*, 2003). En nuestro área de estudio, la presencia de una infección mixta es coherente con la posibilidad de infección con las cepas más prevalentes. Debido a que la infección de un animal producida por varias cepas es muy difícil de detectar, el uso combinado de MLVA y el espoligotipado podrían ser las herramientas asequibles para discriminar estas infecciones mixtas.

Otra de las aplicaciones a la que ha dado lugar el uso de los *loci* MIRU-VNTR y el espoligotipado es su uso como marcadores evolutivos. La hipótesis de este proceso de microevolución para este grupo de aislados de *M. bovis* de origen animal en este área restringida nace al observar que 64 de los 66 aislados tipificados como SB0822, SB01232 y SB1233 comparten el mismo patrón MIRU-VNTR (6-4-5-4-11-4-3-2). La presencia de los espaciadores en sus perfiles podría ser compatible con un paso microevolutivo (SB0822→SB1232→SB1233) basándose en la pérdida de un único espaciador o un grupo de espaciadores contiguos de los dos últimos perfiles respecto al primer. El espoligotipo SB0822 podría derivar de un aislado con el espoligotipo SB0120 que contiene todos los espaciadores para *M. bovis* y que es un patrón ampliamente distribuido en España. De la misma manera, los espoligotipos SB0134 y SB1234 difieren entre ellos en la pérdida de los espaciadores 31-34 que podría haber ocurrido en un único evento, y únicamente difieren en el marcador VNTR2163b (QUB11b). Sin embargo, la relación entre los espoligotipos SB0295 y SB1230, que varían en presencia de los espaciadores 8-13 y el *locus* MIRU4, no está clara ya que el lince infectado con el aislado de *M. bovis* SB0295 procedía del área de Sierra Morena. Gracias a la combinación del espoligotipado y MLVA postulamos que éstos son ejemplos de la aparición de nuevas cepas que se separan de los clones preexistentes y que pueden ser detectados mediante el análisis de la pérdida de espaciadores en el *locus* DR. Este evento también ha sido descrito en aislados clínicos de *M. tuberculosis* y en el estudio realizado sobre el origen y la evolución de la población de *M. bovis* en Gran Bretaña (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006a).

La aparición de nuevas cepas a partir de una antigua ha sido objeto de varios estudios, y se ha discutido sobre la prevalencia de nuevas cepas o la reducción de la diversidad a causa de varios procesos evolutivos: el barrido selectivo mediante un proceso de selección natural, en el que las nuevas cepas presentan alguna ventaja evolutiva con respecto a la anterior; o el cuello de botella en la población, que



implica una reducción de la misma. La obtención de cepas derivadas de aislados clínicos en el laboratorio es otro de los ejemplos de microevolución de los aislados. La cepa vacunal de *M. bovis* (*M. bovis* BCG) presenta variaciones en su genoma según se ha ido subcultivando en el laboratorio, y todas ellas se consideran cepas isogénicas. La detección de las cepas isogénicas puede resultar complicada si no se emplean las técnicas moleculares adecuadas. En nuestro estudio, la obtención de la cepa isogénica en el laboratorio a partir de un aislado clínico de *M. tuberculosis* fue posible gracias a la identificación de un perfil de espoligo distinto en el que se había producido la pérdida del espaciador 2 (posición en la membrana comercial). En este caso el análisis de los 14 loci MIRU-VNTR no diferenció ambas cepas y fue necesario recurrir a la amplificación de la región adyacente al espaciador deletado. Dependiendo de la cepa se obtuvieron tres resultados distintos: i) tamaño de banda correspondiente con la presencia del espaciador 2 (aislado clínico y primer subcultivo); ii) tamaño de banda correspondiente con la ausencia del espaciador 2 (dos últimos subcultivos); y iii) doble tamaño de banda, en la que coexisten ambas cepas (cuatro subcultivos intermedios). La pérdida de este espaciador y una región de repetición (DR) adyacente, confirmada mediante secuenciación, no indica si la delección que se produce es “espaciador-DR” o “DR-espaciador”. Es de suponer que la delección fue un evento que ocurrió en una única célula que se multiplicó de forma eficaz. Ambas poblaciones coexistieron durante un periodo de tiempo y el espoligotipado no fue capaz de detectarlas ya que las imágenes superpuestas indicarían siempre la presencia del espaciador 2. Aunque se desconocen los mecanismos que causaron la delección se puede especular sobre una posible ventaja selectiva para el crecimiento de la nueva cepa con respecto al del aislado clínico. Sin embargo, aunque los subcultivos se hicieron cogiendo mucho crecimiento del subcultivo anterior, no podemos descartar la posibilidad de una selección aleatoria de la cepa mutada. En estos casos en los que se sospecha de la aparición de cepas isogénicas es importante descartar la contaminación cruzada en el laboratorio. En nuestro caso, el aislamiento de *M. tuberculosis* de animales es un evento esporádico. Este motivo, junto a la ausencia de aislados clínicos del laboratorio con un perfil similar, hace descartar la contaminación cruzada.

Este estudio de las cepas isogénicas en el que se realizó una búsqueda de mutaciones producidas en el laboratorio representa una modelo de variación *in vitro* y los resultados podrían extrapolarse también a los procesos de evolución que ocurren de forma natural en los aislados de MTBC en el campo. Sería importante determinar si esos pequeños cambios en el genoma, y la persistencia de los aislados tienen alguna implicación sobre la virulencia de las cepas. Algunos estudios realizados sobre la virulencia de aislados de *M. tuberculosis* o *M. bovis* han mostrado una asociación entre mutaciones presentes en el gen *phoP* (implicado en la regulación de proteínas), que reduce tanto la virulencia de la cepa como sus características morfológicas (Frigui *et al.*, 2008), o la inserción de secuencias de inserción en regiones que pueden sobreexpresar estos genes (Pérez *et al.*, 2001a). Algunos estudios realizados en la última década se han centrado en los procesos implicados en los cambios genéticos en la región DR mediante la comparación de cepas de *M. tuberculosis* con algunas características en común o aislados de una misma familia, no siendo estrictamente isogénicos. Entre los procesos más plausibles se encuentran la inserción o delección de una secuencia de inserción IS6110 (van

Embden *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2002; Sampson *et al.*, 2003), o la pérdida de un espaciador y su región adyacente DR (DVR) o la pérdida de varios DVRs contiguos (Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002). Esta misma explicación se podría aplicar a los procesos de microevolución observados entre las cepas de *M. bovis* del Parque Nacional de Doñana. Según los criterios de interpretación de los espoligotipos, las dos cepas isogénicas de *M. tuberculosis* no estarían incluidas en el mismo grupo por presentar espoligotipos distintos y el vínculo entre ellas podría no haber sido detectado. La idea de que esta misma delección pudiera ocurrir *in vivo* hace plantearse que la información obtenida mediante espoligotipado siempre debe ser completada con una información detallada y precisa de la infección, como la proporcionada por la epidemiología clásica y el estudio de contactos. Por ende, es importante tener en cuenta estos eventos relativos a la evolución en la región DR para la interpretación de los resultados obtenidos mediante espoligotipado y para el diseño de las bases de datos.

Como ha quedado demostrado en numerosas ocasiones, las técnicas de caracterización molecular son un pilar fundamental para realizar estudios epidemiológicos y establecer relaciones entre los distintos brotes de una infección tuberculosa. Debido al carácter zoonótico de esta infección, el estudio de los aislados de *M. bovis* de procedencia animal y humana con patrones moleculares similares resulta de elevada importancia, ya que establece una base firme para complementar los datos aportados mediante la epidemiología clásica, como por ejemplo el estudio de contactos. Aunque la prevalencia de la tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* es muy baja, la mayoría de los aislados en humanos ha dado lugar a diversos estudios epidemiológicos (Cosivi *et al.*, 1998; Grange, 2001; Centers for Diseases Control and Prevention, 2005). Tal fue el caso de un brote nosocomial de tuberculosis debido a una cepa de *M. bovis* multirresistente que tuvo lugar en la década de los años 90, que afectó a pacientes portadores del virus VIH, principalmente, y que tuvo unas consecuencias dramáticas (Guerrero *et al.*, 1997). El primer estudio llevado a cabo para establecer un origen animal (ganado bovino) como posible fuente de infección de este brote se incluye en esta tesis doctoral (Romero *et al.*, 2006). Aunque el espoligotipado agrupó a los aislados animales y humanos (SB0426), la secuenciación parcial del locus DR y la técnica MLVA revelaron espaciadores no presentes en la membrana comercial y distintos perfiles MIRU-VNTR en los aislados humanos (diferencia en los marcadores VNTR3232 y VNTR2165), respectivamente. Por lo tanto, el análisis exhaustivo de los marcadores moleculares descarta a los tres aislados bovino como una fuente de infección directa del brote multirresistente en humanos. El espoligotipo se considera un buen método de tipado para los organismos del complejo *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997; Roring *et al.*, 1998), y se ha demostrado su aplicación en estudios epidemiológicos habituales en aislados animales (Haddad *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2008; Boniotti *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010). Sin embargo, su nivel de discriminación podría no ser suficiente para establecer la identidad definitiva. El uso de MLVA o el análisis de otros espaciadores no incluidos en la membrana comercial, mediante secuenciación o mediante la creación de una membrana con espaciadores adicionales, es esencial para mejorar el grado de diferenciación entre las cepas. En este sentido, estos resultados resaltan la importancia de combinar las técnicas de tipado para conseguir

una discriminación adecuada, incluso para los espoligotipos que se encuentran con baja prevalencia.

Hasta la fecha, no ha sido identificado un origen animal para este brote en humanos y el riesgo de infección procedente del ganado bovino ha disminuido como resultado de las campañas de erradicación. Sin embargo, el consumo de alimentos con *M. bovis* como la leche o sus derivados sin pasteurizar o el contacto con los animales de caza infectados, son factores de riesgo a tener en cuenta en la transmisión de esta enfermedad. Se podría especular sobre una posible transmisión de la infección del ganado bovino al hombre en los años 50, cuando se usaba la isoniazida como promotor del crecimiento en el ganado bovino. Este hecho pudo generar resistencia a este antibiótico en las cepas animales y transmitirse al hombre. Un diagnóstico inadecuado de la cepa en humanos, unido a la resistencia innata de *M. bovis* a la pirazinamida, favoreció la adquisición del resto de resistencias. La transmisión de la tuberculosis de los animales al hombre sí que ha sido detectada en otros estudios, estando asociada en su mayoría al consumo de leche infectada o sus derivados crudos, principalmente en países con una alta prevalencia de la infección en el ganado bovino (Dankner *et al.*, 1993; Dankner y Davis, 2000; Centers for Diseases Control and Prevention, 2005; Rodwell *et al.*, 2008), o al personal que está en contacto con estos animales infectados o sus carcasas (Wilkins *et al.*, 2008). La transmisión de la infección por *M. bovis* entre los humanos se considera un evento raro, y en la mayoría de los casos el desarrollo de la enfermedad depende una buena medida del estado del sistema inmunitario. Por lo tanto, aquellas personas con inmunodeprimidas o con el sistema inmunológico más débil (por ejemplo los niños) desarrollan con más probabilidad la enfermedad que las sanas (Evans *et al.*, 2007; Sunder *et al.*, 2009; Etchechoury *et al.*, 2009).

En lo que respecta a la técnica MLVA, la selección de los marcadores MIRU-VNTR es importante para realizar una buen tipado molecular de los aislados. Debido a la falta de consenso internacional es necesario hacer una evaluación de la diversidad ofrecida por cada *locus* y la discriminación al combinar distintos *loci*. Aunque diversos artículos han publicado la diversidad alélica que ofrecen hasta más de 30 *loci*, la ausencia de estandarización de esta técnica en cuanto a los marcadores a estudiar, así como al orden en el que se deben expresar los perfiles y su posible nomenclatura internacional, dificulta la comparación de los aislados de los distintos brotes. El grupo de trabajo encargado de las técnicas de caracterización molecular de *M. bovis* en la Acción Coordinada Europea VENoMYC (SSPE-CT-2004-501903) hizo una selección de seis marcadores (VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, QUB 11a, QUB 26 y MIRU 4) y sugirió su uso en todos los estudios epidemiológicos por su alta variabilidad alélica. Además de estos *loci*, cada país incluirá los marcadores que sean más polimórficos para sus aislados.

Para mejorar la discriminación de la membrana tradicional de espoligotipado y como método alternativo a MLVA, se ha propuesto el uso de nuevos espaciadores del locus DR. En el estudio realizado sobre un total de 308 aislados de *M. bovis* y 88 *M. caprae*, combinando 68 espaciadores (43 de la membrana comercial y 25 en estudio), se observó un incremento en el número de perfiles de 31 a 45. Esa mejora únicamente se observó en los patrones de *M. bovis* (40 perfiles en lugar de 26). Además, estos espaciadores pudieron diferenciar ocho de los 16 espoligotipos que

incluían al menos dos aislados. Siete de estos perfiles se subdividieron en dos subtipos, y el más prevalente en España (SB0121), en 8 subtipos. Por lo tanto, la inclusión de estos espaciadores mejora de forma significativa la diferenciación de aislados para la realización de estudios epidemiológicos y filogenéticos. Estudios previos también han demostrado un aumento en el número de perfiles en aislados del complejo *M. tuberculosis* al incluir espaciadores adicionales a la membrana comercial, tanto para aislados de *M. bovis* (van der Zanden *et al.*, 2002) como para *M. africanum* (Brudey *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestro estudio no ha aportado perfiles adicionales para los aislados de *M. caprae* aunque sí que se ha observado en otros aislados de origen español y alemán (van der Zanden *et al.*, 2002). Los polimorfismos del locus DR también se han usado para distinguir las especies del complejo *M. tuberculosis*. De los incluidos en este estudio los espaciadores 49, 50, 56 y 58-68 no están presentes en los aislados de *M. bovis* españoles analizados, suceso previamente descrito (van der Zanden *et al.*, 2002). La selección de un lote de 39 espaciadores ofreció el total de discriminación para los aislados de *M. bovis* y *M. caprae* y sólo 35 de ellos fueron necesarios para obtener la máxima discriminación para los aislados de *M. bovis*. Algunos de los espaciadores descritos como muy discriminatorios en otros estudios no ofrecieron buenos resultados para los aislados españoles (van der Zanden *et al.*, 2002). Por lo tanto, las diferencias existentes en la utilidad de algunos espaciadores en la discriminación de esta técnica dependen tanto de la especie del complejo *M. tuberculosis* como del área geográfica en el que se han aislado.

La principal preocupación de la tuberculosis bovina recae en el carácter zoonótico de la enfermedad, es decir, en la posibilidad de transmisión de los animales al hombre. Sin embargo, poco se ha tenido en cuenta la posibilidad de transmisión inversa en el que *M. tuberculosis* fuera el principal agente etiológico. El diagnóstico, detección y recuperación de *M. tuberculosis* en tres vacas procedentes de tres explotaciones independientes representan los primeros casos descritos de la infección tuberculosa causada por *M. tuberculosis* en el ganado bovino en España y en Europa occidental en los últimos 50 años. El aislamiento de esta bacteria mediante el sistema de cultivo líquido BACTEC MGIT 960 corrobora que estos medios líquidos favorecen la recuperación de este patógeno, hecho que ha sido demostrado en los laboratorios de la Salud Pública durante años. En el estudio epidemiológico analizamos cinco parámetros importantes: 1) la respuesta inmunológica; 2) la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis; 3) la edad del animal; 4) la coinfección con *M. bovis*; y 5) el origen de la infección. El diagnóstico de la infección tuberculosa en estos animales mediante la respuesta inmunológica a la prueba de la tuberculinización fue posible en dos de los tres animales infectados. Otros estudios anteriores también confirmaron esta respuesta del sistema inmunológico a la infección por *M. tuberculosis* (Srivastava *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Fetene *et al.*, 2009). La confirmación de la infección mediante el cultivo microbiológico sin una respuesta inmunológica previa es un suceso inusual pero es importante tener en cuenta la posibilidad de animales falsos negativos. Una de las posibles hipótesis es una infección reciente del animal, y el crecimiento de los bacilos en el corto periodo de tiempo que transcurre entre la realización de la prueba en el animal y el sacrificio del mismo. En este caso, la alta sensibilidad del sistema de cultivo BACTEC MGIT podría recuperar la baja carga bacteriana de los estadios iniciales de la infección. La recuperación de un escaso número de colonias de animales infectados

experimentalmente con *M. tuberculosis* corrobora esta hipótesis (Whelan *et al.*, 2010). Además, este hecho sugiere que *M. tuberculosis* es capaz de persistir en el ganado bovino con una carga bacilar baja. Al igual que han descrito ya otros autores (Lesslie, 1960; Ocepek *et al.*, 2005; Whelan *et al.*, 2010), en nuestro estudio destacamos la ausencia de lesiones compatibles con tuberculosis en las muestras analizadas. Por otra parte, sí que se ha descrito la presencia de lesiones en vacas infectadas con *M. tuberculosis* en India, China y Nigeria (Cadmus *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados de este estudio y la ausencia de lesiones patológicas, *M. tuberculosis* parece que no está bien adaptado al ganado bovino ya que las cepas fueron aisladas únicamente de un animal de cada explotación y no se detectó la transmisión en la ganadería. El importante papel que tienen los programas de erradicación de la tuberculosis bovina permite la detección temprana de la infección de los animales. Por lo tanto, la ausencia de lesiones también podría ser compatible con la eliminación periódica de los animales. Además, la detección de la infección del animal sin reacción inmunológica en el laboratorio mediante el cultivo bacteriológico tiene una gran importancia en la confirmación de la infección. La edad de los tres animales infectados fue inferior a los nueve meses lo que sugiere la mayor facilidad de infección de éstos a diferencia de los animales de mayor edad. Otros casos de infección de animales jóvenes se han descrito en Europa del Este y en los años 50 en Reino Unido (Lesslie, 1960; Ocepek *et al.*, 2005). Por otra parte, también se detectó la coinfección con *M. bovis* de una de las explotaciones y el aislamiento del mismo del 51% de los animales reactivos. Este hecho informa de la incapacidad de *M. tuberculosis* de transmitirse entre el ganado a diferencia de la diseminación de *M. bovis* en la explotación. La búsqueda del origen de la infección confirmó en las tres explotaciones una persona enferma con tuberculosis activa, destacando la multiresistencia (resistencia a la isoniazida y rifampicina) de una de las cepas humanas con el mismo espoligotipo que la cepa bovina. Ésta es la primera descripción de una infección por *M. tuberculosis* multiresistente en vacas, lo que aumenta la preocupación de su transmisión al hombre. Por todo ello consideramos que es necesaria la cooperación entre los sistemas de la Sanidad Animal y la Salud Pública y que ambos servicios se deberían notificar las infecciones producidas por los miembros del complejo *M. tuberculosis* cuando existe un vínculo epidemiológico para llevar a cabo una lucha más eficaz contra la infección.

La incidencia de la tuberculosis en humanos causada por los miembros del complejo *M. tuberculosis* está aumentando a nivel mundial. Esta enfermedad causa alrededor de 1,8 millones de muertes al año y por ello es necesario un tratamiento eficaz. El tratamiento de la tuberculosis en humanos se caracteriza por ser prolongado (seis meses) y por el uso combinado de tres antibióticos (isoniazida, rifampicina y pirazinamida). La aparición de resistencias en las cepas obliga a un cambio en la medicación, usando otros antibióticos de primera o de segunda línea que pudieran resultar menos eficaces. Por lo tanto, el seguimiento de la sensibilidad antibiótica de los aislados del complejo *M. tuberculosis* es importante para asegurar la puesta en marcha de una terapia adecuada. Aunque *M. bovis* está muy relacionado con el ámbito veterinario y la transmisión entre personas no es común, se han descrito recientemente varios brotes de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* que se comporta como la infección por *M. tuberculosis* (Evans *et al.*, 2007;

Etchechoury *et al.*, 2009). A pesar del carácter zoonótico de esta enfermedad existe muy poca información sobre la sensibilidad antibiótica de aislados animales. Por ello realizamos un análisis de la sensibilidad antibiótica de aislados de *M. bovis* y *M. caprae* a cinco fármacos antituberculosos mediante el antibiograma o el estudio de mutaciones en los genes implicados en la resistencia antibiótica. Este estudio fue el primero llevado a cabo con aislados de *M. caprae* y se incluyeron además los aislados de origen bovino con el mismo espigotipo que los aislados multirresistentes de *M. bovis* humanos (SB0426). Todos los aislados fueron sensibles a los cinco antibióticos (isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y ofloxacina) mediante el método de las proporciones (Canetti *et al.*, 1963). Estos resultados corroboran la ausencia de presión antibiótica en los animales debido a la prohibición del tratamiento en el ganado infectado, por lo que resulta indispensable mantener la prohibición del tratamiento en animales para evitar la aparición de resistencias. Según estos datos la posibilidad de transmisión de un aislado resistente de origen animal al hombre resulta poco probable. La ausencia de resistencias en los aislados españoles de origen animal es comparable con la sensibilidad a la isoniazida y rifampicina de los aislados de *M. bovis* de Reino Unido (Hughes *et al.*, 2003), a la INH, RIF, STR y EMB en Brasil (Parreiras *et al.*, 2004) y a la INH, RIF, EMB y a las quinolonas en Estados Unidos (Daly *et al.*, 2006). Sin embargo, estos resultados contrastan con los altos porcentajes de resistencia encontrados en Italia a la INH y RIF (Sechi *et al.*, 2001; Cavarani *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos por el método de las proporciones en el medio Middlebrook 7H10 con piruvato sódico reafirman que este compuesto afecta a la interpretación de los resultados de la sensibilidad a la isoniazida que había sido descrita en otras especies del género *Mycobacterium* (Garattini y Leonardi, 1954; Pope, 1955; Boisvert, 1970). Además, los resultados corroboran también la necesidad del piruvato para un crecimiento óptimo de la mayoría de los aislados de *M. bovis* (Keating *et al.*, 2005), ya que fue determinante para el crecimiento de 12 de los 35 aislados (34,3%) y para favorecer el crecimiento del resto. Por lo tanto, el uso del método de referencia para estudiar la sensibilidad antibiótica de *M. bovis* a INH queda en entredicho. Gracias a la confirmación de la sensibilidad antibiótica a la INH de seis aislados por el método líquido automatizado ESP Culture System II, recomendamos el uso de este sistema para la evaluación de la sensibilidad a la INH en *M. bovis*.

El análisis de la sensibilidad antibiótica mediante secuenciación de los genes implicados en la resistencia mostró que algunos aislados presentaban mutaciones puntuales en cinco de los nueve genes estudiados (*katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB* y *gyrA*), y ninguno de estos cambios había sido descrito con anterioridad en otros miembros del complejo tuberculoso sensibles o resistentes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el método microbiológico de las proporciones de Canetti, planteamos que estas mutaciones de un único nucleótido, detectadas en los aislados de *M. bovis*, no parecen estar implicadas en la resistencia antibiótica. Si bien es cierto que la presencia de ciertas mutaciones en algunos genes lleva asociada la resistencia a un determinado antibiótico, –como por ejemplo la presencia de mutaciones en el gen *rpoB* y la resistencia a la rifampicina en el 95% de las cepas resistentes–, la ausencia de polimorfismos no implica la sensibilidad de la cepa, ya

que algunas cepas de *M. tuberculosis* resistentes no han mostrado variabilidad genética en los principales genes descritos (Ramaswamy *et al.*, 2003). Por lo tanto, estos polimorfismos deberían ser confirmados siempre mediante el antibiograma. Los polimorfismos hallados también podrían ser útiles para determinar o descartar vínculos epidemiológicos entre los aislados. El uso combinado de las técnicas moleculares permitió detectar las mismas substituciones nucleotídicas en aislados que compartían el mismo espoligotipo, como por ejemplo la mutación silente GCT→GCG en el gen *rpsL* y el espoligotipo SB0886. Esto indica firmemente que estas mutaciones estarían conservadas y que esta cepa sería responsable de estos brotes de tuberculosis bovina (diseminación clonal). Por otra parte, la información disponible de la secuencia del gen *katG* y *rpoβ* (Blázquez *et al.*, 1997) de los aislados de *M. bovis* multirresistentes procedentes del brote en humanos reafirma que no existe relación epidemiológica directa entre los aislados humanos y los bovinos con el mismo espoligotipo (SB0426). El cambio aminoacídico Pro533Leu en el gen *katG* de los aislados bovinos está presente en los aislados multirresistentes, y el cambio Ser531Leu en el gen *rpoβ* no está presente en los aislados de origen animal. Este hecho corrobora los resultados obtenidos mediante secuenciación del locus DR y MLVA (Romero *et al.*, 2006). El estudio mediante secuenciación de los nueve genes implicados en la resistencia antibiótica en los dos aislados de *M. bovis* MDR de origen humano mostró mutaciones en cinco de los nueve genes estudiados (*ahpC*, *rpoβ*, *rpsL*, *embB* y *gyrA*). Cuatro de los seis polimorfismos observados están asociados a la resistencia a la RIF (Morgan *et al.*, 2005), alto nivel de resistencia a la STR (Meier *et al.*, 1996), EMB (Parsons *et al.*, 2005), y las fluoroquinolonas (Giannoni *et al.*, 2005), habiendo sido descritas todas estas mutaciones en aislados de *M. tuberculosis* resistentes. Además, la secuenciación de los genes *ahpC* y *rpsL* reveló dos mutaciones de diferenciación entre el primer y el último aislado del brote. El análisis de los genes implicados en la resistencia a la isoniazida no mostró polimorfismos asociados a la misma, por lo que el mecanismo genético de resistencia a la isoniazida se desconoce. Por lo ello concluimos que la resistencia antibiótica en estos aislados de origen animal no existe, hecho que en el caso de transmisión de la infección de los animales al hombre no dificultaría el tratamiento. Como consecuencia, la aparición de resistencias en humanos podría deberse al abandono en la medicación por parte del enfermo o a un tratamiento inadecuado ya que, debido al lento crecimiento de estas bacterias, el tratamiento suele comenzar antes de conocer los resultados de la sensibilidad antibiótica. En el caso de la tuberculosis debida a *M. bovis*, el tratamiento único con INH y RIF podría favorecer la aparición de resistencias, por lo que la identificación de la especie causante de la enfermedad es esencial. Debido a la urgencia de comenzar el tratamiento antibiótico en humanos, el conocimiento de las mutaciones más frecuentes puede ayudar a desarrollar test moleculares rápidos y precisos para la detección de resistencias y así optar por el tratamiento apropiado en cada caso.

## **CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

### PRIMERA

La realización de estudios epidemiológicos de la tuberculosis bovina causada por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* resulta necesaria para establecer la fuente de infección, y conocer la diseminación y/o el mantenimiento de la infección en los animales domésticos y salvajes, siendo el espigotipado y el análisis de las repeticiones en tándem MIRU-VNTR las técnicas de elección para *Mycobacterium bovis* y *M. caprae*.

### SEGUNDA

El sistema de cultivo líquido BACTEC MGIT 960 ha detectado una emergencia de tuberculosis bovina producida por *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta fundamentalmente a animales jóvenes y cursa sin lesiones compatibles con tuberculosis. En todos los casos se ha relacionado con el contacto con personas con tuberculosis activa.

### TERCERA

Los procesos de microevolución detectados en los brotes de la tuberculosis en el campo o en el laboratorio mediante la pérdida de espaciadores del locus DR y la conservación de los marcadores MIRU-VNTR podría ser compatible con la evolución de las cepas, pudiendo producirse la delección de un único espaciador y su región de repetición adyacente o de varios espaciadores contiguos.

#### CUARTA

Hasta el momento no se ha podido vincular un origen animal al brote de tuberculosis multirresistente causado por *Mycobacterium bovis* en humanos en la década de los años 90. La homología de las cepas humanas y animales se descarta mediante el análisis de los marcadores MIRU-VNTR y la secuenciación del *locus* DR.

#### QUINTA

Todos los aislados de *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* de origen animal son sensibles a los antibióticos usados para tratar la tuberculosis en el hombre. Este hecho corrobora la efectividad de la prohibición del tratamiento de los animales con tuberculosis incluida en los programas de erradicación.

#### SEXTA

El método de las proporciones de Canetti en el medio sólido Middlebrook 7H10 es adecuado para determinar la sensibilidad antibiótica de *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* a la rifampicina, la estreptomycin, el etambutol y la ofloxacina. Sin embargo, la sensibilidad a la isoniazida no debe ser evaluada mediante este método, ya sea en presencia o en ausencia de piruvato sódico.

#### SÉPTIMA

El estudio de los genes implicados en la resistencia antibiótica de aislados de *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* de origen animal, así como de los aislados multirresistentes de *M. bovis*, se complementa con el método convencional del antibiograma aunque los mecanismos genéticos de resistencia a la isoniazida en los aislados multirresistentes aún se desconocen. Los estudios de vigilancia de la resistencia antibiótica deberían incluirse en los programas de control de la tuberculosis bovina.

## **RESUMEN/SUMMARY**



## RESUMEN

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) contiene las especies de mayor importancia sanitaria del género *Mycobacterium*. Dicho complejo está formado por siete especies, siendo *Mycobacterium tuberculosis* la más importante a nivel de Salud Pública. En Sanidad Animal, *Mycobacterium bovis* es el patógeno por excelencia que causa tuberculosis en el ganado bovino aunque presenta un amplio rango de hospedadores, incluyendo a los animales salvajes y al hombre; y por otro lado *Mycobacterium caprae* es el principal productor de tuberculosis en cabras. La erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino es el objetivo de todos los programas de lucha contra la enfermedad y constituye una prioridad esencial, tanto para la protección de la Salud Pública frente a esta enfermedad zoonótica como para el mantenimiento del bienestar animal, incluyendo el buen funcionamiento del mercado de animales vivos y sus productos. Para lograr esta erradicación es indispensable la mejora en las herramientas de diagnóstico y control de la infección. Con este propósito, el objetivo global de esta tesis centra sus investigaciones en el estudio epidemiológico de la tuberculosis en mamíferos, tanto en animales domésticos como salvajes, mediante el diagnóstico de la infección por métodos de cultivo microbiológico, así como la caracterización molecular de los aislados obtenidos en los estudios; todo ello para una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad, incluyendo su diseminación y la sensibilidad antibiótica de los aislados y, en especial, el papel que la fauna salvaje puede tener en el mantenimiento de la misma.

En el primer capítulo se incluyen dos estudios sobre la epidemiología de la tuberculosis en ganado bovino y animales salvajes mediante el cultivo microbiológico y la caracterización molecular de los aislados. El primer estudio se diseñó para

conocer la prevalencia de la tuberculosis en el Parque Nacional de Doñana sobre un total de 1.209 muestras recogidas de ganado bovino y animales salvajes mediante la confirmación de la enfermedad por cultivo, así como para estudiar la epidemiología molecular de la población de *M. bovis*. Durante un periodo de seis años las tasas de infección encontradas mediante cultivo bacteriológico fueron muy altas (7,96% en ganado bovino y 20,53% en animales salvajes). La caracterización molecular de los aislados mediante espoligotipado reveló nueve perfiles distintos, siendo los perfiles mayoritarios el SB1232 y SB1230 (77,30% y 15,34% de los animales infectados, respectivamente). El análisis de ocho marcadores MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repeat unit/variable number of tandem repeat*) no ofreció una discriminación mayor que el espoligotipado. Ambas técnicas corroboraron la infección con las mismas cepas en el ganado bovino y los animales salvajes y, además, se confirmó la persistencia de estas cepas a lo largo de todo el estudio. Por otra parte, la variación genotípica observada mediante el espoligotipado entre los aislados agrupados en el mismo perfil MIRU-VNTR sugirió varios eventos de microevolución en la población de *M. bovis* en este área. Asimismo, el análisis mediante MIRU-VNTR permitió la detección de una doble infección en un jabalí y una vaca por los dos espoligotipos más prevalentes en la zona.

El segundo estudio de este capítulo incluyó la detección de la infección tuberculosa en el ganado bovino causada por *M. tuberculosis* mediante el sistema líquido automatizado BACTEC MGIT 960. La importancia de este suceso recae sobre la capacidad de infección de este patógeno adaptado al hombre en los animales. *M. tuberculosis* se aisló de tres animales pertenecientes a tres explotaciones distintas y fueron caracterizadas en tres espoligotipos. Dos de los tres animales infectados mostraron una respuesta inmunológica a la intradermotuberculinización (IDTB) y ninguna de las muestras de los animales remitidas a los laboratorios presentó lesiones compatibles con tuberculosis. Además, la infección por *M. tuberculosis* en los tres casos se detectó en animales jóvenes. Una exhaustiva investigación epidemiológica estableció al personal como la fuente de infección, siendo uno de los aislados humanos una cepa multiresistente (resistente a la isoniazida y rifampicina). El riesgo de transmisión de esta cepa multiresistente no solo recae en el impacto que podría tener en Salud Pública sino en el posible riesgo de diseminación entre el ganado. La tendencia actual del uso de los sistemas líquidos en los laboratorios de diagnóstico veterinarios acelera la confirmación de la infección y aumenta la sensibilidad del cultivo. Además, la necesidad de cooperación entre los sistemas de Sanidad Pública y Sanidad Animal se hace patente en este artículo.

El segundo capítulo incluye el diseño y aplicación de las técnicas de caracterización molecular como herramienta epidemiológica de la tuberculosis bovina en aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de origen animal (doméstico y salvaje) y de origen humano. En general se ha llegado a un consenso sobre cuáles son las técnicas de más utilidad para la tipificación de los aislados del complejo *M. tuberculosis* y, principalmente para *M. bovis* son el espoligotipado y el análisis de los marcadores MIRU-VNTR. Ambas técnicas han sido adoptadas en la mayoría de los laboratorios porque son rápidas, sencillas y económicas, ya que están basadas en la PCR. Además, presentan la ventaja añadida de generar resultados cualitativos que pueden ser comparados entre los distintos estudios realizados a nivel

nacional e internacional. En el primer trabajo realizamos un análisis molecular de varias cepas isogénicas obtenidas mediante subcultivo en el laboratorio a partir de un aislado de *Mycobacterium tuberculosis* procedente de un perro infectado. El subcultivo siempre se hizo a partir del cultivo anterior, habiéndose realizado siete pases durante cinco años. Mediante la técnica de espoligotipado se observó la pérdida del espaciador número 2 en los dos últimos subcultivos con respecto a los cinco previos. También se observaron diferencias en el fragmento amplificado entre los espaciadores 1 y 4 de cada subcultivo: para el aislado clínico y el primer subcultivo, 259 pares de bases; para los dos últimos subcultivos, 187 pares de bases; y para los 4 subcultivos intermedios, una doble banda con ambos tamaños de banda. Estos resultados indican la presencia y la coexistencia de dos poblaciones en el mismo tiempo, dato imposible de detectar mediante el espoligotipado debido a que la superposición de ambos perfiles siempre dio lugar a la presencia del espaciador 2. El análisis del aislado clínico y del último subcultivo mediante 14 marcadores MIRU-VNTR no mostró diferencias. Por lo tanto, este estudio corrobora la hipótesis de la pérdida de DVRs únicos o múltiples como mecanismo de variación entre las cepas.

El segundo trabajo estudia la implicación de tres aislados animales en Salud Pública como posible fuente de infección en el brote de tuberculosis en humanos causado por una cepa de *M. bovis* multirresistente (resistencia a 11 antibióticos antituberculosos) mediante el uso de herramientas moleculares. La característica común entre los aislados animales y humanos era su espoligotipo (SB0426), siendo un perfil poco frecuente en animales. El análisis de los aislados mediante los marcadores MIRU-VNTR como método más discriminatorio que el espoligotipado y la secuenciación de un fragmento del locus DR mostraron la existencia de un patrón distinto entre los aislados humanos y animales, por lo que el origen animal del brote de *M. bovis* multirresistente en humanos permanece sin identificar.

El tercer estudio de este capítulo evalúa la discriminación que ofrecen 25 nuevos espaciadores del locus DR en comparación con la membrana tradicional en una selección de 308 aislados de *M. bovis* y 88 de *M. caprae*, todos ellos de origen animal. La combinación de ambas membranas aumentó el número de espoligotipos de 31 a 45, aunque este aumento se dio únicamente en *M. bovis* (de 26 a 40 espoligotipos). Tanto la membrana comercial como la diseñada en este estudio diferenciaron las especies *M. bovis* y *M. caprae*. Los nuevos espaciadores diferenciaron los aislados incluidos en ocho de los 16 espoligotipos iniciales que presentaban más de un aislado: el más prevalente en España (SB0121) fue subdividido en ocho subtipos, y los siete perfiles restantes en dos subtipos cada uno. Por otra parte, el análisis de los 68 espaciadores (43 de la membrana comercial y 25 de la membrana nueva) mostró que sólo 13 de ellos generaron 29 espoligotipos. Un total de 39 espaciadores ofrecieron la mayor discriminación para *M. bovis* y *M. caprae*, y sólo con 35 espaciadores se obtuvo la mayor discriminación para *M. bovis*. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos espaciadores y el diseño de una membrana pueden ser útiles para la realización de estudios epidemiológicos en aislados de *M. bovis* y *M. caprae*.

Por último, el tercer capítulo resalta la importancia de los miembros de *M. tuberculosis* como agentes zoonóticos y, por ende, el problema que pueden suponer en Salud Pública. De ahí la importancia de controlar la sensibilidad antibiótica de los aislados animales que pueden transmitirse al hombre a pesar de la prohibición del



tratamiento de esta enfermedad en animales. Debido a la escasez de información a nivel mundial relativa a la sensibilidad antibiótica de los aislados del complejo *M. tuberculosis* de origen animal consideramos esencial realizar este estudio mediante dos métodos: uno basado en el antibiograma por el método de las proporciones, y otro basado en la detección mediante secuenciación de mutaciones en genes asociados a la resistencia antibiótica. En el primer trabajo evaluamos la sensibilidad antibiótica a la isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y ofloxacina de 46 aislados de *M. bovis* y *M. caprae* de origen animal, bovino principalmente, mediante el antibiograma y el análisis de los genes implicados en la resistencia antibiótica. La secuenciación de los genes mostró mutaciones en cinco de los nueve genes estudiados (*katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB*, y *gyrA*), no descritas previamente en otros organismos del complejo *M. tuberculosis* sensibles o resistentes. La sensibilidad a los fármacos antituberculosis se realizó en el medio Middlebrook 7H10 con y sin piruvato sódico. Todos los aislados fueron sensibles a los cinco antibióticos mediante el método de las proporciones aunque se detectó un efecto inhibitorio en la isoniazida por la presencia del piruvato sódico. Por otra parte fue imposible evaluar la sensibilidad antibiótica a la isoniazida en más de un tercio de los aislados por su falta de crecimiento en los medios sin piruvato. La sensibilidad a la isoniazida se comprobó en seis aislados de *M. bovis* con crecimiento por el método de las proporciones mediante el método líquido automatizado ESP Culture System II, y todos fueron sensibles. Por lo tanto, la sensibilidad antibiótica en estos aislados de origen animal concuerda con ausencia de presión antibiótica debido a la prohibición del tratamiento de los animales infectados.

En el segundo trabajo de este capítulo se aborda únicamente la resistencia a los antibióticos usados frente a la tuberculosis mediante el estudio de las mutaciones asociadas a determinados genes. Con este objeto partimos de dos aislados de origen humano representativos del brote de *M. bovis* multirresistente (a 11 antibióticos) que se dio en un hospital en Madrid en los años 90. Mediante amplificación por PCR y secuenciación estudiamos los principales genes implicados en la resistencia antibiótica: isoniazida (*katG*, *ahpC*, *inhA*, y la región intergénica *oxyR-ahpC*), rifampicina (*rpoB*), estreptomycin (*rrs*, *rpsL*), etambutol (*embB*) y quinolonas (*gyrA*). Cinco de los nueve genes estudiados presentaron mutaciones (*ahpC*, *rpoB*, *rpsL*, *embB* y *gyrA*), y esas substituciones supusieron un cambio aminoacídico en cuatro de los genes. Además, dos mutaciones adicionales en *ahpC* y *rpsL* diferenciaron el primer y el último aislado del brote. El análisis de los genes implicados en la resistencia a la isoniazida no mostró polimorfismos asociados a la misma, por lo que el mecanismo genético de resistencia a la isoniazida se desconoce. Sin embargo, un cambio de aminoácido en la posición 531 del gen *rpoB* fue la causa de la resistencia a la rifampicina. También se observaron substituciones no sinónimas en ambos aislados en los genes implicados en la resistencia a la estreptomycin (AAG→AGG, Lys43Arg), etambutol (ATG→GTG, Met306Val) y a las quinolonas (TCG→CCG, Ser91Pro). Todas estas mutaciones encontradas en ambos aislados habían sido descritas previamente en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estos antibióticos. Por lo tanto, la detección de mutaciones previamente asociadas a la resistencia antibiótica representa una ventaja en la selección de antibióticos para el tratamiento adecuado de la tuberculosis en el hombre.

## SUMMARY

*Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) is the cluster of pathogens which poses the higher health concern within the genus *Mycobacterium*. MTBC comprises seven species, being *Mycobacterium tuberculosis* the most relevant pathogen for Public Health. Regarding Animal Health, *Mycobacterium bovis* is the main pathogen that causes tuberculosis in cattle although it has a wide-host range such as wildlife and human beings. *Mycobacterium caprae*, on the other hand, is the main agent of tuberculosis in goats. The eradication of bovine tuberculosis is the key objective of all programs against this disease. These programmes constitute a priority not only for Public Health but also for the animal welfare, including the market of live animals and their products. To achieve the eradication of bovine tuberculosis is essential to improve the diagnostic tools and to control the infection. With this purpose, the global objective of this thesis is to study the epidemiology of bovine tuberculosis in mammals (domestic or wild animals) by means of diagnosis of the infection by bacteriological methods and by molecular characterization of the isolates derived from the studies. These studies will improve our understanding on the epidemiology of the disease, including its dissemination, the antibiotic resistance of the isolates and, in special, the role of wildlife in the maintenance of tuberculosis.

The first chapter includes two studies about the epidemiology of tuberculosis in cattle and wildlife by culture and molecular characterization of the isolates. The first study was designed to estimate the prevalence of the tuberculosis infection in the Doñana National Park on 1,209 samples from cattle and wild animals. The infection was confirmed by bacteriological culture and the molecular epidemiology of the *M. bovis* population was studied. The prevalence of the infection during the six-year period was very high (7.96% in cattle and 20.53% in wild animals). Molecular characterization of the isolates showed nine spoligotyping profiles, being SB1232 and

SB1230 the most frequent spoligotypes (77.30% and 15.34% of infected animals, respectively). The analysis of eight MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repeat unit/variable number of tandem repeat) markers did not show higher discrimination than spoligotyping. Both techniques corroborate the infection of cattle and wild animals with the same strains, and also the persistence of these strains through the study. On the other hand, genotype variation was observed among the isolates by the combination of both techniques and micro-evolutionary steps in the *M. bovis* population in this area were also suggested. In addition, the analysis by MIRU-VNTR allowed the detection of co-infection in a cow and a wild boar with the two most prevalent strains in this area.

The second study of this chapter reports on the detection of tuberculosis infection due to *M. tuberculosis* in cattle by means of the BACTEC MGIT 960 culture system. The relevance of this finding relies on the ability of this pathogen to infect animals despite it is adapted to humans. *M. tuberculosis* was isolated from three animals from different cattle farms and the isolates were characterized in three spoligotypes. Two out of the three infected animals reacted to the single intradermal test and none of the animals showed tuberculosis-compatible lesions. Moreover, in all cases the *M. tuberculosis* infection was detected in young animals. An exhaustive epidemiological investigation established the staff with active tuberculosis in the farms as the source of the infection for cattle. A multi-drug resistant (MDR) strain (at least to isoniazid and rifampicin) was isolated from a worker in one farm. The high concern of the transmission of a MDR strain relies not only on the possibility to return to the human population and the impact on public health, but also on the hypothetical risk of dissemination among cattle. The current trend of diagnostic veterinary laboratories to use these liquid systems is recommended for the prompt confirmation of the *M. tuberculosis* complex infection and also for enhancing the sensitivity of culture. In addition, the need of a close co-operation between Veterinary and Public Health Systems is highlighted in this study.

The second chapter includes the design and application of molecular techniques as an epidemiological tool for bovine tuberculosis caused by any member of the MTBC, not only from animal origin (domestic or wild animals) but also from human beings. In general terms, there is a general agreement with the most useful techniques to type the isolates from the MTBC: spoligotyping and multi-locus MIRU/VNTR analysis. Both techniques have been implemented in the majority of laboratories since they are quick, easy and have an excellent cost-benefit balance since they are PCR-based techniques. An additional advantage is that the results can be compared between studies performed in the same country or at international level. In the first study we analyzed several isogenic strains by molecular techniques. These strains were obtained by subculture in the laboratory from a *M. tuberculosis* isolate from a dog. Seven subcultures were done from the initial culture during five years. The spoligotyping technique showed the loss of the spacer no. 2 in the two last subcultures in relation to the previous ones. Moreover, the amplified product between the spacers nos. 1 and 4 differed in size: 259 bp for the clinic isolate and the first subculture; 187 bp for the two last subcultures; and double band with both sizes for the other four subcultures. These results showed the presence and coexistence of two populations at the same time. This fact was impossible to be detected by

spoligotyping due to the superimposed images of both profiles and the presence of the spacer 2 in all subcultures. The 14 *loci* MIRU-VNTR analysis did not find differences among them. Therefore, this study corroborates the hypothesis of deletion of a single spacer and its direct repeat region or multiple DVRs as a mechanism of strain-to strain variation.

The second work studies the implication of three cattle *M. bovis* isolates in the Public Health as a source of infection to humans by means of molecular tools. An outbreak of tuberculosis in humans due to a multi-drug resistant *M. bovis* strain occurred in the 90s in Madrid. This strain showed resistance to 11 antibiotics. Both animals and human isolates shared an uncommon spoligotyping profile in animals (SB0426). The molecular analysis of the isolates by MIRU-VNTR *loci*, and the partial sequence analysis of the DR locus distinguished human and cattle isolates. Therefore, the origin of the MDR *M. bovis* outbreak in humans remains still unknown.

In our third study we evaluated the discrimination of 25 novel spacers of the DR locus in a new membrane compared to the commercial one, in a selection of 308 *M. bovis* and 88 *M. caprae* isolates. All of them were recovered from several animal species. The combination of both membranes increased the number of spoligotypes from 31 to 45 although this increase was only observed in the *M. bovis* isolates (from 36 to 40 profiles). Both membranes were able to distinguish between *M. bovis* and *M. caprae* species. The spacers used in the second membrane were also able to distinguish eight out of the 16 *M. bovis* types that had more than one isolate: seven of these types were differentiated into two subtypes with the second-generation membrane, while SB0121, the most prevalent in Spain, was further differentiated into eight subtypes. On the other hand, the analysis of the 68 spacers (43 from the commercial membrane and 25 from this study) showed that only 13 spacers yielded 29 spoligotyping profiles. Moreover, a selection of 39 and 35 spacers provided the highest discrimination for *M. bovis* and *M. caprae*, and only for *M. bovis*, respectively. Therefore our results show that the research on new spacers and the design of a new membrane may be useful for epidemiological studies of *M. bovis* and *M. caprae* isolates.

Finally, the last chapter enhances the relevance of the members of the *M. tuberculosis* complex as zoonotic agents and also the derived problems for the Public Health. For this reason, it is important to control the drug sensitivity of the isolates recovered from animals that could be transmitted to humans. Due to the lack of information about the drug susceptibility of the members of the *M. tuberculosis* complex isolated from animals, we considered important to study this drug susceptibility by two methods: the antibiogramme by the proportion method, and the study of genes involved in drug resistance by sequencing analysis. In the first study we evaluated the drug susceptibility to isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, and ofloxacin in a selection of 46 *M. bovis* and *M. caprae* isolates from animal origin. Sequencing analysis showed single nucleotide polymorphisms in five out of the nine studied genes (*katG*, *inhA*, *rpsL*, *embB*, and *gyrA*). These mutations have not been previously described either in sensitive or resistant members of the *M. tuberculosis* complex. Middlebrook 7H10 media with and without pyruvate was used for the evaluation of the sensitivity by the proportion method. All isolates were sensitive to the five antibiotics although sodium pyruvate interfered with the isoniazid. Moreover the

susceptibility to isoniazid could not be evaluated for one third of the isolates in the media without pyruvate due to the absence of growth. Then, the isoniazid susceptibility was checked for six isolates by ESP Culture System II and all were sensitive. In conclusion, the drug susceptibility of the *M. bovis* and *M. caprae* isolates from animal origin is in agreement with the ban of treatment of infected animals.

In the second work we focus on the correlation between the drug sensitivity and the single nucleotide polymorphisms in genes associated to drug resistance. With this purpose, several genes from two isolates from the human Spanish outbreak caused by a MDR *M. bovis* strain were studied. The main genes involved in the resistance to isoniazid (*katG*, *ahpC*, *inhA*, and the intergenic region *oxyR-ahpC*), rifampicin (*rpoB*), streptomycin (*rrs*, *rpsL*), ethambutol (*embB*), and quinolones (*gyrA*) were sequenced. Five out of the nine genes (*ahpC*, *rpoB*, *rpsL*, *embB*, and *gyrA*) showed mutations and four of them involved an aminoacidic change. The analysis of genes involved in the isoniazid resistance did not show associated mutations. However, an aminoacidic change was observed in *rpoB* (Ser531Leu), *rpsL* (Lys43Arg), *embB* (Met306Val), and *gyrA* (Ser91Pro) genes. These mutations have been previously described in *M. tuberculosis* resistant strains for these antibiotics. Therefore, knowledge and detection of frequent mutations would help in the development of precise molecular tests to quickly detect antibiotic resistance.

**ANEXO**



## Anexo I. Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

*ahpC*: gen que codifica la alquil hidroperóxido reductasa

DR: repetición directa (*direct repeat*)

DVR: repetición directa variable (*direct variable repeat*)

EMB: etambutol

*embB*: gen que codifica la arabinosil transferasa

*gyrA*: gen que codifica la ADN girasa, subunidad A

INH: isoniazida

*inhA*: gen que codifica la enoil ACP reductasa

IS: secuencia de inserción (*insertion sequence*)

*katG*: gen que codifica la catalasa-peroxidasa

MDR: multirresistente (*multidrug-resistance*)

MIRU: unidad de repetición dispersa en las micobacterias (*mycobacterial interspersed repeat unit*)

MLVA: análisis del número de repeticiones en tándem de múltiples loci (*multi-locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis*)

MPTR: secuencias de repetición en tándem con polimorfismos mayoritarios (*major polymorphic tyem repeat*)

MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*)

OFX: ofloxacina

ORF: marco de lectura abierto (*open reading frame*)

*oxyR-ahpC*: región intergénica del pseudogen *oxyR* y el gen *ahpC*

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PGRS: secuencias polimórficas con un alto contenido en G+C (*polymorphic GC-rich sequence*)

Proteínas PE: proteínas con motivos prolina-ácido glutámico

Proteínas PPE: proteínas con motivos prolina-prolina-ácido glutámico

RIF: rifampicina

RFLP: análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*)

*rpoβ*: gen que codifica la ARN polimerasa, subunidad β

*rpsL*: gen que codifica la proteína ribosomal S12



*rrs*: gen que codifica el ARN ribosómico 16S

STR o SM: estreptomicina

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

VNTR: número variable de repeticiones en tándem (*variable number of tandem repeat*)

## Anexo II. Lista de figuras

**Figura 1.** Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento

**Figura 2.** Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento rápido

**Figura 3.** Esquema del proceso de evolución del bacilo tuberculoso

**Figura 4.** Filogenia del linaje RD9 delecionado y *M. tuberculosis* con las regiones delecionadas (RDs), polimorfismos de un único nucleótido y la pérdida de espaciadores usados para la definición de los grupos

**Figura 5.** Estado de la tuberculosis bovina en los estados miembros en el año 2008

**Figura 6.** Proporción de rebaños infectados por *M. bovis* en 2008, datos expresados por países

**Figura 7.** Prevalencia de rebaño e incidencia en animales con tuberculosis bovina 1986-2008

**Figura 8.** Esquema del locus DR y de la técnica de espoligotipado

**Figura 9.** Esquema de la realización de la técnica MIRU-VNTR

## Anexo III. Lista de tablas

**Tabla 1.** Características fenotípicas de las principales especies del complejo *M. tuberculosis*

**Tabla 2.** Prevalencia de rebaño de tuberculosis bovina por CCAA en el periodo 2001-2008 (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino)

**Tabla 3.** Polimorfismos de un solo nucleótido que diferencias los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**Tabla 4.** Aislamientos de *M. bovis* y casos totales de tuberculosis en humanos notificados al Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades, 2008

**Tabla 5.** Actividad, mecanismos de acción y de resistencia de los antimicrobianos antituberculosos de primera línea

**Tabla 6.** Genes implicados en la aparición de la resistencia antibiótica y frecuencia de aparición de mutantes

**Tabla 7.** Genes o enzimas del metabolismo basal seleccionados para realizar estudios epidemiológicos en aislados del género *Mycobacterium*

**Tabla 8.** Perfiles de espoligotipos característicos de los miembros del complejo *M. tuberculosis*

**Tabla 9.** Estudios de frecuencia de espoligotipos y discriminación de la técnica realizados en Europa

**Tabla 10.** Marcadores MIRU-VNTR recomendados según la bibliografía para los aislados del complejo *M. tuberculosis*

## Anexo IV. Lista de otros trabajos derivados de la tesis

**Romero B.**, Bezos J., Aranaz A., Álvarez J., de Juan L., Vela A.I., Montero N., Mateos A., Domínguez L. Homogeneidad genética en las cepas de *Mycobacterium bovis*. XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Santiago de Compostela, 21-25 Septiembre 2003.

**Romero B.**, Bezos J., Aranaz A., de Juan L., Montero N., Mateos A., Domínguez L. Genetic homology between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates. First General Meeting of the Coordination Action SSPE-CT-2004-501903 (VENoMYC). Segovia, 14-17 Octubre 2004.

**Romero B.**, Bezos J., Álvarez J., de Juan L., Aranaz A., Mateos A., Domínguez L. MLST approach to the study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals. Med-Vet-Net Annual Meeting. Winchester, Reino Unido, 29 Junio-1 Julio 2005.

**Romero B.**, Aranaz A., Bezos J., Álvarez J., de Juan L., Mateos A., Domínguez L., Gómez-Mampaso E. Drug susceptibility of *Mycobacterium bovis* isolates from animal sources. The Fourth International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dublin, Ireland, 22-25 Agosto 2005.

**Romero B.**, Aranaz A., Bezos J., Álvarez J., de Juan L., Mateos A., Vela A.I., Gómez-Mampaso E., Domínguez L. Genetic homology within *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. The Fourth International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dublin, Ireland, 22-25 Agosto 2005.

**Romero B.**, Bezos J., Aranaz A., de Juan L., Álvarez J., Mateos A., Gómez-Mampaso E., Domínguez L. Molecular study of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from human sources and comparison with *M. bovis* isolates from animals. The Fourth International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dublin, Ireland, 22-25 Agosto 2005.

**Romero B.**, Bezos J., Álvarez J., de Juan L., Aranaz A., Mateos A., Gómez-Mampaso E. y Domínguez L. Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos en *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* de origen animal. XX Congreso Nacional de Microbiología. Cáceres, 19-22 Septiembre 2005.

**Romero B.**, Bezos J., Álvarez J., Aranaz A., de Juan L., Castellanos E., Lozano F., Moya N., Mateos A., Gómez-Mampaso E., Domínguez L. MIRU-VNTR and DR region analysis of animal and multidrug-resistant (MDR) human *Mycobacterium bovis* isolates. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists. Madrid, 4-8 de Julio de 2006.

**Romero B.**, Álvarez J., de Juan L., Bezos J., Aranaz A., Castellanos E., Rodríguez S., Moya N., Lozano F.J., Mateos A., Domínguez L. MIRU-VNTR analysis of Spanish *M. bovis* and *M. caprae* isolates. Workshop "VNTR/MIRU and DVR-Spoligotyping for *Mycobacterium bovis* typing". Proyecto Europeo SSPE-CT-2004-501903 (VENoMYC). Toledo, 19-21 de octubre de 2006.

**Romero B.**, Bezos J., Álvarez J., Aranaz A., de Juan L., Lozano F., Mateos A., Domínguez L., Trávníček M. 2006. Bovinná tuberkulóza v EÚ – prítomnosť a budúcnosť. Slovenský Veterinársky Casopis (Slovak Veterinary Journal), XXXI: 3, 165-168.

**Romero B.**, Rodríguez S., Álvarez J., Aranaz A., de Juan L., Mateos A., Gómez-Mampaso E. and Domínguez L. Antibiogramme of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates of animal origin. Póster. 3<sup>rd</sup> Med-Vet-Net Annual Scientific Meeting. Lucca (Italia), 27-30 junio de 2007.

**B. Romero.** 2007. Tuberculosis en España. Weblog de Seguridad Alimentaria y Alimentación. Ciencia y Tecnología. Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Programa I+D de la Comunidad de Madrid.

**Romero B.**, Bezos J., Rodríguez S., Álvarez N., Moya N., Aranaz A. and Domínguez L. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by spoligotyping and MIRU-VNTR. Comunicación oral. 14th International Symposium for the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Madrid, 18-20 de junio de 2009.

**Romero B.**, Bezos J., Álvarez J., Castellanos E., de Juan L., Rodríguez S., Lozano F.J., Mateos A., Aranaz A., Domínguez L. Proper identification of the causative agents of animal micobacteriosis for the Tuberculosis Eradication Programme. Comunicación oral. *M. bovis* V Conference. Wellington, Nueva Zelanda, 25-28 agosto de 2009.

**B. Romero**, S. Rodríguez, L. de Juan, E. Castellanos, J. Bezos, N. Moya, F. Lozano, O. Mínguez, R. Díaz, E. Fernández, A. Mateos, L. Domínguez. *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle. Póster. 31<sup>st</sup> Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Bled (Eslovenia), 4-7 junio de 2010.

### Homogeneidad genética en las cepas de *Mycobacterium bovis*

Romero, B., Bezos, J., Aranaz, A., Álvarez, J., de Juan, L., Vela, A.I., Montero, N.,  
Mateos, A., Domínguez, L.

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avenida Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid.

*Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina y presenta un amplio espectro de hospedadores mamíferos tanto domésticos como salvajes. Todas las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en el que está incluido *M. bovis*, presentan un 99,9% de homología en su ADN debido a la reciente especiación de los miembros del complejo. Una de las alternativas para estudios epidemiológicos ha sido el desarrollo de diversas técnicas moleculares que detectan polimorfismos interespecíficos e intraespecíficos.

En este estudio evaluamos la homología de varios genes del metabolismo basal de *Mycobacterium bovis*. Con este objetivo seleccionamos 8 cepas de *Mycobacterium bovis* y 5 cepas de *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* (nuevo nombre propuesto *Mycobacterium caprae*) aisladas en diferentes años, de distintas especies animales, procedentes de varias áreas geográficas y clasificadas en distintos spoligotipos. Además incluimos una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*. Se estudiaron mediante secuenciación 6 genes que codifican las enzimas catalasa-peroxidasa (*katG*), tiol peroxidasa (*tpx*), fosfomano isomerasa (*manA*), isocitrato deshidrogenasa (*icd2*), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (*zwf2*) y parte de la subunidad B de la girasa (*gyrB*). Cuatro de los genes estudiados presentaron diferencias genéticas (*katG*, *manA*, *zwf2* y *gyrB*) y los otros dos fueron idénticos en todas las cepas del estudio. En los cuatro genes en los que existía variabilidad alélica ampliamos el estudio a otras cepas relacionadas epidemiológicamente.

Analizamos el gen *katG* de 15 cepas de las cuales 11 presentaron la misma secuencia nucleotídica (Alelo 1); en las 4 restantes hallamos un cambio en una de sus bases (Alelo 2). Éstas fueron aisladas de animales pertenecientes a la misma explotación y tres de ellas estaban clasificadas dentro del mismo spoligotipo.

Secuenciamos también el gen *manA* de 38 cepas. Treinta y cuatro de ellas fueron idénticas genéticamente (Alelo 1) y tres presentaron una variante alélica (Alelo 2). La otra cepa presentó dos mutaciones (Alelo 3). Las 4 cepas que presentaron polimorfismos se aislaron de cerdos y jabalíes y procedían de explotaciones diferentes.

El gen *zwf2* fue idéntico en 12 (Alelo 1) de las 13 cepas en estudio y hallamos un polimorfismo en una cepa de *M. bovis* subsp. *caprae* (Alelo 2).

En el gen *gyrB* todas las cepas de *M. bovis* presentaron la misma secuencia (Alelo 1) y encontramos las mutaciones características de *Mycobacterium tuberculosis* (Alelo 2) y de *M. bovis* subsp. *caprae* (Alelo 3).

La cepa de *Mycobacterium tuberculosis* tomada como control presentó el Alelo 1 en todos los genes analizados excepto en el gen *gyrB*.

En este estudio preliminar de genes del metabolismo basal de *Mycobacterium bovis* ponemos de manifiesto la escasa variabilidad genética que presenta esta especie, lo que dificulta la puesta a punto de la técnica MLST (*Multilocus Sequence Typing*). A pesar de este hecho, hay que destacar que todas las cepas de nuestro estudio que presentaron variabilidad genética tenían relación epidemiológica.

**Genetic homology within *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates**

B. Romero<sup>1\*</sup>, A. Aranaz<sup>1</sup>, J. Bezos<sup>1</sup>, J. Álvarez<sup>1</sup>, L. de Juan<sup>1</sup>, A. Mateos<sup>1</sup>, A.I. Vela<sup>1</sup>, E. Gómez-Mampaso<sup>2</sup> and L. Domínguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain. Email:

*M. bovis* has the broadest host range of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. caprae* has been found in goats. Several molecular techniques have been developed to detect polymorphisms to perform epidemiological studies. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) is a nucleotide-base method that analyzes between 6 and 8 housekeeping genes (Enright y Spratt, 1999) and has already been applied to many bacterial pathogens. Due to the 99% similarity at the genome of the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex it might be necessary to characterize more rapidly evolving loci for epidemiological purposes, such as encoding antigens and antibiotic-resistance determinants or the location of insertion sequences.

In this study we have evaluated the homology of several genes (housekeeping and antibiotic resistance) in representative *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*. We chose 43 *M. bovis* and 5 *M. caprae* isolated from different animal sources, several geographical areas and classified in 38 spoligotypes. We included as control a *Mycobacterium tuberculosis* isolate. Fifteen complete genes (or parts containing the expected polymorphism) were characterized by DNA sequencing. Target genes are involved in carbohydrates and lipids metabolism or involved in antibiotic resistance. Several genes showed polymorphisms and most of them are found among species. Twelve genes showed mutations within the same species.



**MLST approach to the study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals**

Romero B., Bezos J., Álvarez J., de Juan L., Aranaz A., Mateos A., Domínguez L.

Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Spain.

Several molecular techniques have been developed to detect polymorphisms to perform epidemiological studies. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) is a nucleotide-base method that analyzes between 6 and 8 housekeeping genes (Enright y Spratt, 1999) and has already been applied to many bacterial pathogens. Due to the 99% similarity at the genome of the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (Brosch *et al.*, 2002) it might be necessary characterize more rapidly evolving loci for epidemiological purposes, such as encoding antigens and antibiotic-resistance determinants or the location of insertion sequences.

In this preliminary study we evaluated the homology of several genes (housekeeping and antibiotic resistance) in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*.

We chose eight *M. bovis* and five *M. caprae* isolated from several geographical areas, isolated from different animals and in several years and classified in different spoligotypes. We included as control a *Mycobacterium tuberculosis* isolate. Six complete genes (or parts containing the expected polymorphism) were characterized by DNA sequencing.

The genes are involved in carbohydrates metabolism and antibiotic resistance. Five of six genes showed polymorphisms and most of them are found among species. Also there were mutations within the same species that could help us to distinguish strains typified into the same spoligotype. However the low genetic variability in the members of the *M. tuberculosis* complex hampers the development on the technique MLST.

### Drug susceptibility of *Mycobacterium bovis* isolates from animal sources

B. Romero<sup>1</sup>, A. Aranaz<sup>1</sup>, J. Bezos<sup>1</sup>, J. Álvarez<sup>1</sup>, L. de Juan<sup>1</sup>, A. Mateos<sup>1</sup>, L. Domínguez<sup>1</sup>  
and E. Gómez-Mampaso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain. Email:

Bovine tuberculosis is a zoonosis and transmission of *M. bovis* from domestic and wild animals to humans has been reported. However there are very few studies about drug susceptibility of *M. bovis* isolated from animals. Sechi et al. (2001) found an isoniazid and rifampicin resistance prevalence rate of 63.6 % in Italy; however Parreiras et al. (2004) did not find any drug resistance in Brazil. To date, most of the resistant *M. bovis* have been isolated from human beings.

The objective of this study was to determine the drug susceptibility of *M. bovis* from animals in Spain. We chose 35 representative strains (32 *M. bovis* and 3 *M. caprae*) isolated from several geographical areas, from different animals and years and classified in different spoligotypes. We included the *Mycobacterium tuberculosis* ATCC27294 as positive control. We evaluated the drug susceptibility of these strains towards antibiotics currently used for first line therapy in human tuberculosis such as isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, and a quinolone (ofloxacin). Susceptibility studies were performed using the proportion method described by Canetti, Rist and Grosset (1963). Mycobiogrammes were performed in Middlebrook 7H10 medium containing pyruvate in order to enhance the growth of *M. bovis*. Isoniazid was also tested in Middlebrook 7H10 without pyruvate.

**Genetic homology within *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates**

B. Romero<sup>1</sup>, A. Aranaz<sup>1</sup>, J. Bezos<sup>1</sup>, J. Álvarez<sup>1</sup>, L. de Juan<sup>1</sup>, A. Mateos<sup>1</sup>, A.I. Vela<sup>1</sup>, E. Gómez-Mampaso<sup>2</sup> and L. Domínguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain. Email:

*M. bovis* has the broadest host range of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. caprae* has been found in goats. Several molecular techniques have been developed to detect polymorphisms to perform epidemiological studies. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) is a nucleotide-base method that analyzes between 6 and 8 housekeeping genes (Enright y Spratt, 1999) and has already been applied to many bacterial pathogens. Due to the 99% similarity at the genome of the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex it might be necessary to characterize more rapidly evolving loci for epidemiological purposes, such as encoding antigens and antibiotic-resistance determinants or the location of insertion sequences.

In this study we have evaluated the homology of several genes (housekeeping and antibiotic resistance) in representative *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*. We chose 43 *M. bovis* and 5 *M. caprae* isolated from different animal sources, several geographical areas and classified in 38 spoligotypes. We included as control a *Mycobacterium tuberculosis* isolate. Fifteen complete genes (or parts containing the expected polymorphism) were characterized by DNA sequencing. Target genes are involved in carbohydrates and lipids metabolism or involved in antibiotic resistance. Several genes showed polymorphisms and most of them are found among species. Twelve genes showed mutations within the same species.

**Molecular study of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from human sources and comparison with *M. bovis* isolates from animals**

B. Romero<sup>1</sup>, J. Bezos<sup>1</sup>, A. Aranaz<sup>1</sup>, L. de Juan<sup>1</sup>, J. Álvarez<sup>1</sup>, A. Mateos<sup>1</sup>, E. Gómez-Mampaso<sup>2</sup> and L. Domínguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain. Email:

*Mycobacterium bovis* is the main organism responsible for tuberculosis in cattle but its implication in human tuberculosis has been recognized since the beginning of the twentieth century. During 1993-1995 there was an outbreak of human tuberculosis due to multidrug-resistant (MDR) *M. bovis* in Spain (Guerrero et al., 1997) that later spread to other countries (Rivero et al., 2001; Long et al., 1999; Samper et al., 1997). These isolates were typified by spoligotyping SB0426 and RFLP and the *rpoB* gene was studied (Blazquez et al., 1997).

The spoligotype SB0426 is infrequent in Spain and a search in our database of spoligotyping profiles from *M. bovis* of animal origin identified the same spoligotype in only three cattle in a farm in central Spain. We have studied the possible relationship among these strains. Two MDR *M. bovis* isolates from the human outbreak and the bovine isolates were characterized by sequencing of target genes involved in isoniazid, rifampin, streptomycin, ofloxacin and ethambutol resistance. Additionally, as many of the polymorphisms occur within regions of tandemly repeated DNA, we amplified the most discriminative variable-number tandem repeats (VNTR). MDR strains had mutations in several genes associated with drug resistance and the bovine isolates had a mutation in the *katG* gene. Both groups were also differentiated by VNTR analysis. With these results we can state that to date, the animal origin of the MDR strains has not been demonstrated.

**Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos en *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* de origen animal.**

Romero, B.<sup>1</sup>, Bezos, J.<sup>1</sup>, Álvarez, J.<sup>1</sup>, de Juan, L.<sup>1</sup>, Aranaz, A.<sup>1</sup>, Mateos, A.<sup>1</sup>, Gómez-Mampaso, E.<sup>2</sup> y Domínguez, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid.

La tuberculosis bovina es una zoonosis y la transmisión de *M. bovis* de los animales domésticos y salvajes a los humanos se ha descrito. Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre la sensibilidad de *M. bovis* aislados de animales. Según Sechi et al. (2001) la prevalencia de *M. bovis* resistentes a la isoniazida y a la rifampicina en Italia fue del 63,6%; por otra parte, Parreiras et al. (2004) no encontraron ninguna resistencia antimicrobiana en Brasil. Hasta la fecha, la mayoría de las cepas de *M. bovis* resistentes a los fármacos usados frente a la tuberculosis se han aislado de humanos.

El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad de *M. bovis* aislados de animales en España.

Elegimos 35 cepas representativas (32 *M. bovis* y 3 *M. caprae*) aislados de varias especies animales y en varios años, procedentes de distintas regiones y clasificadas en diferentes spoligotipos. Como control positivo incluimos la cepa *Mycobacterium tuberculosis* ATCC27294. Evaluamos la sensibilidad de estas cepas a los antibióticos de primera línea usados frente a la tuberculosis en humanos tales como la isoniazida, rifampicina, estreptomycin y etambutol, además de una quinolona (la ofloxacina). Los antibiogramas se realizaron usando el método de las proporciones descrito por Canetti, Rist and Grosset (1963). El medio usado, Middlebrook 7H10, se suplementó con piruvato para favorecer el crecimiento de *M. bovis* y, de forma paralela, se usaron tubos sin piruvato con isoniazida.

Todas las cepas fueron sensibles a la rifampicina, estreptomycin, etambutol y ofloxacina. Sin embargo, los resultados obtenidos en los medios con isoniazida difirieron dependiendo de la presencia o ausencia del piruvato.

Con este estudio de la susceptibilidad de *M. bovis* y *M. caprae* aislados de animales concluimos que todas las cepas son sensibles a la rifampicina, estreptomycin, etambutol y ofloxacina. Sin embargo, la susceptibilidad a la isoniazida no puede ser evaluada debido a que existe un posible mecanismo de supresión del piruvato sobre el antibiótico.

**Bibliografía**

- Canetti et al. 1963. Rev Tuberc Pneumol (Paris), 27: 217-272.
- Parreiras et al. 2004. Mem Inst Oswaldo Cruz, 99:749-752.
- Sechi et al. 2001. Antimicrob Agents Chemother, 45:1645-1648.

**MIRU-VNTR and DR region analysis of animal and multidrug-resistant (MDR) human  
*Mycobacterium bovis* isolates**

Romero B<sup>1</sup>, Bezos J<sup>1</sup>, Álvarez J<sup>1</sup>, Aranaz A<sup>1</sup>, de Juan L<sup>1</sup>, Castellanos E<sup>1</sup>, Lozano FJ<sup>1</sup>,  
Moya N<sup>1</sup>, Mateos A<sup>1</sup>, Gómez-Mampaso E<sup>2</sup> and Domínguez L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Anima, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid;

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain.

Bovine tuberculosis is a zoonotic disease that is mainly caused by *Mycobacterium bovis*. The eradication programmes and hygienic measures have greatly reduced the incidence of *M. bovis* tuberculosis in humans. In spite of this, several cases of human tuberculosis due to *M. bovis* have been reported in recent years, such as a MDR outbreak occurred in Spain. The epidemiological monitoring system of animal tuberculosis revealed some bovine isolates that shared the same spoligotyping profile as the MDR *M. bovis* isolates. This fact may indicate direct or indirect cattle-to-human transmission.

This research was carried out to assess the ability of the direct repeat (DR) region analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing to ascertain the clonality of the studied isolates.

Our results showed that the animal and human isolates were differentiated by the MIRU-VNTR and also detailed DR region analysis. Thereby, molecular characterization rule out these cattle isolates as direct source of the MDR human outbreak.

**MIRU-VNTRs analysis of Spanish *M. bovis* and *M. caprae* isolates**

Romero B., Álvarez J., de Juan L., Bezos J., Aranaz A., Castellanos E., Rodríguez S.,  
Moya N., Lozano F.J., Mateos A., Domínguez L.

Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,  
Madrid, Spain.

The use of the MIRU-VNTR technique is increasing for the *M. bovis* typing because its discriminatory power seems to be higher than spoligotyping. However this measure depends on the combination of loci used and the geographic origin of the isolates.

Our preliminary study was developed to assess the discriminatory power of eight MIRU-VNTR markers (QUB 26, 3232, 11a, 11b, ETR-A, ETR-B, MIRU 4, MIRU 40) in a panel of 42 *M. bovis* and 5 *M. caprae* isolates from Spain. They were collected from goats (n=5), cattle (n=32), swine (n=3), red deer (n=2), fox (n=1), wild boar (n=2) and human being (n=2). We intentionally chose isolates with different spoligotyping patterns (35 spoligotypes) without an evident epidemiological link among them, except in the two following cases. Two multidrug-resistant (MDR) *M. bovis* isolates from human beings and three isolates from cattle, that share the spoligotyping profile (SB0426), were included in the study to determine if both groups were clonal.

The number of allelic variants of each locus ranged from 3 alleles (MIRU 40) to 8 and 10 (ETR-A and QUB 3232, respectively). The discriminatory power of the individual locus differed greatly, with allelic diversity (h) ranking from 0.07 (MIRU 40) to 0.81 (QUB 3232). The combination of solely four VNTR (QUB 3232, 11a, 11b and ETR-A) provided a maximal resolution of 36 profiles with a genetic diversity of 0.97.

The five human and cattle *M. bovis* isolates (SB0426), differed in a copy at ETR-A (6 and 5 copies) and at QUB-3232 (7 and 6 copies, respectively), showing the same profile at the other MIRU-VNTRs. Therefore, this technique rule out these cattle isolates as direct source of the MDR human outbreak. These results highlight that a combination of techniques is required for appropriate discrimination.



## BOVINNÁ TUBERKULÓZA V EÚ – PRÍTOMNOSŤ A BUDÚCNOSŤ

Romero, B., Bezos, J., Álvarez, J., Aranaz, A., de Juan, L., Lozano, F., Mateos, A., Domínguez, L. Trávníček, M.\*  
Veterinárna fakulta Univerzity Complutense, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Španielsko  
\*Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 040 81 Košice, Slovenská republika



Tuberkulóza hovädzieho dobytku je väčšinou chronicky prebiehajúca nákazlivá choroba domácich a voľne žijúcich zvierat, vrátane studenokrvných. V chove hovädzieho dobytku spôsobuje významné ekonomické straty. Epizootologický a epidemiologický význam spočíva v tom, že choré zvieratá sú prameňom nákazy pre ostatné zvieratá a človeka. Tuberkulóza patrí medzi významné zoonózy. Tuberkulóza hovädzieho dobytku je v SR a EÚ nákaza povinná hlásením. Všetky členské krajiny Únie majú povinné vypracované eradikačné programy.

### Geografický aspekt tlmenia bovinnej tuberkulózy v EÚ

V rámci EÚ existujú výrazné rozdiely v podmienkach, ktoré priamo vplyvajú na eradikačný proces pri bovinnej tuberkulóze. Jedná sa o veľkosť chovov, tradície v organizovaní chovu HD, rozdiely vo výžive, výrazné rozdiely v klimatických podmienkach, rôzny stupeň súkromného vlastníctva chovov, atď. Uvedené rozdiely existujú aj v rámci jednotlivých členských štátov Únie, príkladom môže slúžiť juh a sever Talianska. Tieto okolnosti je potrebné si uvedomiť pri posudzovaní a pochopení rozdielov v tmení bovinnej tuberkulózy, ale tiež pri vypracovaní eradikačných programov v jednotlivých krajinách a regiónoch EÚ.

Na ilustráciu uvádzame nasledujúce údaje o počte a veľkosti chovov hovädzieho dobytku v EÚ a niektorých členských štátoch.

- V EÚ existuje 2,5 milióna chovov HD.
- V EÚ sa chová 77,5 milióna kusov HD.

Veľkosť chovov v jednotlivých krajinách je veľmi rozdielna.

Priemer EÚ – 32 zvierat/ 1 chov,  
Priemer Cyprus – 225 zvierat/ 1 chov,  
Priemer Litva – 4 zvierat/ 1 chov,  
Priemer Francúzsko – 76 zvierat/ 1 chov.

### Súčasná politika EÚ v súvislosti s bovinnou tuberkulózou

Hlavné princípy a zásady Únie pri tmení bovinnej tuberkulózy sú nasledovné:

Členské štáty Únie sú primárne zodpovedné za opatrenia prijaté na svojom území v súvislosti s tmením bovinnej tuberkulózy; majú možnosť získať komunitárnu finančnú pomoc na tento účel. Konečným cieľom je eradikácia bovinnej tuberkulózy na území EÚ.

Legislatívny rámec tlmenia bovinnej tuberkulózy v EÚ tvoria nasledujúce základné dokumenty:

### 1. Legislatívna upravujúca obchod s hovädzím dobytkom vo vnútri EÚ

Smernica č. 64/432/EEC „O zverozdravotných problémoch ovplyvňujúcich obchodovanie s hovädzím dobytkom a ošpanými vo vnútri EHS“ upravuje tieto oblasti:

- Požiadavky na trh založené na kvalifikácii stád.
- Diagnostika bovinnej tuberkulózy u HD.
- Postupy pre získanie, udržanie, odobratie, odvolanie resp. znovuzískanie statutu „prostý bovinnej tuberkulózy“ (TBOF), založeného na intradermálnom tuberkulinovom teste na úrovni stáda (chovu).

### 2. Legislatívna, týkajúca sa živočíšnych produktov určených pre ľudský konzum

Opatrenia, týkajúce sa čerstvého mäsa:

Smernica č. 64/433/EEC ukladá opatrenia, týkajúce sa zdravotných problémov ovplyvňujúcich intrakomunitárny trh s čerstvým mäsom ako sú:

- Detekcia tuberkulózných zmien počas post-mortem prehliadky na bitúnku.
- Mäso zo zvierat s generalizovanou formou tuberkulózy nesmie byť uvoľnené pre ľudský konzum.
- Sprisnené podmienky pre posudzovanie mäsa pochádzajúceho od zvierat, pozitívne alebo dubiozne reagujúcich v intradermálnom tuberkulinovom teste.

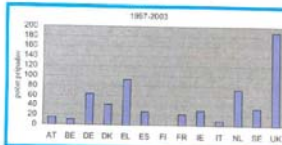
### Opatrenia, týkajúce sa mlieka a mliečnych výrobkov

Smernica č. 92/46/EEC ukladá opatrenia týkajúce sa produkcie, spracovania a obchodu so surovým mliekom, tepelne ošetrovaným mliekom a mliečnych výrobkov v Únii:

- Vylučne mlieko pochádzajúce z tuberkulózy prostých chovov môže byť použité pre ľudský konzum bez predchádzajúceho tepelného ošetrovania.
- Mlieko od pozitívnych reagentov na bovinný tuberkulín nesmie byť použité v žiadnom prípade na ľudský konzum.

### 3. Legislatívna, týkajúca spolufinancovania eradikačných programov zo strany Únie

Rozhodnutie č. 90/424/EEC „Veterinárne finančné výdavky“ definuje:



Obr. 1 Kumulatívne počty tuberkulózy ľudí vyvolaných *M. bovis* v čl. štátoch EÚ – Cumulative data on *M. bovis* infection in humans in the member countries of EU





- podmienky finančnej pomoci zo strany EÚ pri eradikačných a monitorovacích programoch v súvislosti s chorobami zvierat, vyskytujúcimi sa v niektorých endemických oblastiach Únie,
- štandardizáciu eradikačných programov.

### BOVINNÁ TUBERKULÓZA – AKTUÁLNA SITUÁCIA V EÚ

#### Bovinná tuberkulóza u ľudí

Hlásenie prípadov ľudskej tuberkulózy v jednotlivých členských štátoch EÚ vo väčšine prípadov nerozlišuje medzi prípadmi vyvolanými *Mycobacterium bovis* a prípadmi spôsobenými inými mikróbmami z *Mycobacterium spp.* Len časť prípadov spôsobených *M. bovis* je dostupných (Obr. 1).

#### Tuberkulóza hovädzieho dobytku v EÚ

Členské štáty (regióny) EÚ majú, resp. môžu mať v súvislosti s výskytom a eradikáciou bovinnej tuberkulózy nasledujúci štatút:

- **Oficiálne prosté tuberkulózy** (podmienka 99,8 % chovov počas minimálne posledných 3 rokov bolo negatívnych pri vyšetrení kožným tuberkulinovým testom).



Obr. 2 Geografické znázornenie štátov a regiónov EÚ oficiálne prostých bovinnej tuberkulózy (vyznačené tmavo) – Geographical distribution of the Bovine tuberculosis officially free member states and regions of EU (dark)

Medzi oficiálne prosté tuberkulózy patria nasledujúce štáty a regióny EÚ:

- Belgicko, Holandsko, Rakúsko, Slovensko, Fínsko, Švédsko, Taliansko (8 provincií), Francúzsko, Česká republika, Dánsko, Nemecko, Luxembursko.

#### - Neoficiálne prosté tuberkulózy

- Členské štáty EÚ s eradikačným programom spolufinancovaným EÚ.
- Ostatné členské štáty EÚ.

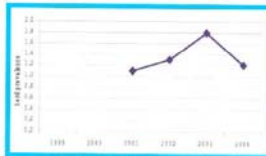
Medzi členské štáty EÚ s eradikačným programom spolufinancovaným EÚ v r. 2004 patria nasledujúce krajiny:

Grécko, Španielsko, Írsko, Taliansko, Portugalsko, Veľká Británia (S. Írsko), Litva, Poľsko.

Konkrétna situácia v týchto krajinách je nasledovná:

#### Grécko

Prevalencia v chovoch: 1,2 %  
Incidenca v chovoch: 0,7 %  
Incidenca u zvierat: 1,0 %  
Chovy prosté: 95,2 %

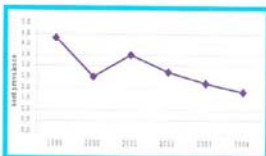


Obr. 3 Prevalencia chovov v Grécku – Herd prevalence in Greece

Komentár: Eradikačný program nie je zavedený úplne. V r. 2004 sa dosiahlo mierne zníženie prevalence v chovoch HD (Obr. 3). Pretrvávajú extrémne vysoká prevalence chovov v regióne Attica.

#### Španielsko

Prevalencia v chovoch: 1,8 %  
Incidenca v chovoch: 1,1 %  
Incidenca u zvierat: 0,5 %  
Chovy prosté: 96,5 %

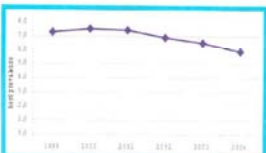


Obr. 4 Prevalencia chovov v Španielsku – Herd prevalence in Spain

Komentár: Prevalencia chovov len pomaly klesá. V niektorých regiónoch – najmä hornatých, ťažko dostupných – stále pretrvávajú veľmi vysoká (Obr. 4).

#### Írsko

Prevalencia v chovoch: 5,9 %  
Incidenca v chovoch: 5,7 %  
Incidenca u zvierat: 0,3 %  
Chovy prosté: 96,9 %

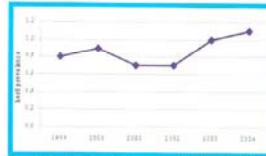


Obr. 5 Prevalencia chovov v Írsku – Herd prevalence in Ireland

Komentár: Prevalencia tuberkulózy v chovoch je stále veľmi vysoká, ale pomaly klesá (Obr. 5).

Taliansko (len regióny, ktoré oficiálne nie sú prosté tuberkulózy)

Prevalencia v chovoch: 1,1 %  
Incidenca v chovoch: 0,6 %  
Incidenca u zvierat: 0,2 %  
Chovy prosté: 90,9 %

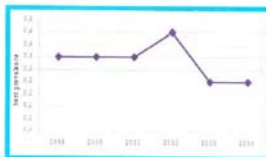


Obr. 6 Prevalencia chovov v Taliansku (len regióny, ktoré oficiálne nie sú prosté tuberkulózy) – Herd prevalence in Italy (only not TBOF regions)

Komentár: Prevalencia v chovoch nachádzajúcich sa v niektorých regiónoch, ktoré oficiálne nie sú prosté tuberkulózy neklesá, ale naopak, v niektorých regiónoch stúpa (Obr. 6). Na druhej strane, niektoré regióny vykazujú progres v eradikácii tuberkulózy a k získaniu štatútu „oficiálne prosté bovinnej tuberkulózy“.

#### Portugalsko

Prevalencia v chovoch: 0,3 %  
Incidenca v chovoch: 0,2 %  
Incidenca u zvierat: 0,1 %  
Chovy prosté: 99,4 %



Obr. 7 Prevalencia chovov v Portugalsku – Herd prevalence in Portugal

Komentár: Trend v prevalencii chovov sa pomaly zlepšuje s výnimkou jedného regiónu. Portugalsko má vysoké percento chovov prostých bovinnej tuberkulózy (Obr. 7).

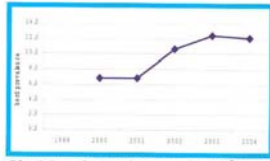
#### Veľká Británia (Severné Írsko)

Prevalencia v chovoch: 12,1 %  
Incidenca v chovoch: 9,1 %  
Incidenca u zvierat: 0,8 %  
Chovy prosté: 95,6 %

Komentár: Prevalencia bovinnej tuberkulózy v chovoch Severného Írska sa udržiava veľmi vysoká. Priaznivá zmena



v tomto trende sa pozorovala v r. 2004 (Obr. 8).



Obr. 8 Prevalencia chovov vo VB (S. Írsko) – Hent prevalence in GB (N. Ireland)

#### Litva

Prevalencia v chovoch: 0 %  
Incidenca v chovoch: 0 %  
Incidenca u zvierat: 0 %  
Chovy prosté: 100,0 %  
Komentár: Vynikajúca situácia. Krajina sa nachádza v 3 ročnom pozorovacom období, počas ktorého výsledky kožného tuberkulinizačného testu musia byť negatívne.

#### Poľsko

Prevalencia v chovoch: 0,05 %  
Incidenca v chovoch: 0,04 %  
Incidenca u zvierat: 0,03 %  
Chovy prosté: 99,99 %  
Komentár: Vynikajúca situácia. Krajina sa nachádza v 3 ročnom pozorovacom období, počas ktorého výsledky kožného tuberkulinizačného testu musia byť negatívne.

#### PROBLEMATIKA BOVINNEJ TUBERKULÓZY V EÚ

Európska únia ako zväzok mnohých štátov s rozdielnou históriou, kultúrami, zvyklosťami, ale najmä geografickou polohou predstavuje súčasne súbor rozdielnych podmienok a rozdielnych regiónov pre tak závažnú celospoločenskú úlohu akou je eradikácia bovinnej tuberkulózy a tlmenie ostatných mykobakteriálnych infekcií ľudí a zvierat. Pri realizácii eradikačných programov musíme brať do úvahy všetky faktory a rešpektovať zvláštnosti, ktoré existujú v reálnych podmienkach a živote.

#### HETEROGÉNNOSŤ

V rámci odvetvia chovu hovädzieho dobytku v EÚ existuje enormný počet systémov chovu a rozdielne environmentálne podmienky. Podmienky chovu v subtropickú oblasti Stredozemného mora a oblastí v blízkosti polárneho kruhu sú diametrálne odlišné.

Rozdielne environmentálne podmienky priamo vplyvajú na ekopizootologické vzťahy a distribúciu *M. bovis* a ostatných patogénov z rodu *Mycobacterium*.

#### KOMPLEXNOSŤ

Epizootológia bovinnej tuberkulózy je často veľmi komplikovaná. Prispievajú k tomu rôzne ekologické podmienky, kde v rôznych biotopoch žijú rôzne rezervoárové zvieratá, pričom cesty prenosu *M. bovis* sú často veľmi komplikované a rozdielne.

Opatrenia na tlmenie a následnú eradikáciu bovinnej tuberkulózy musia byť komplexné a aplikované včas a dlhodobo, inými slovami jedná sa o časovo, ekonomicky a profesionálne náročný proces.

#### ĎALŠIE ŤAŽKOSTI

V epizootológii bovinnej tuberkulózy (ale tiež aviárnej tuberkulózy a paratuberkulózy) môže zohrávať dôležitú, až kľúčovú úlohu veľký počet rôznych druhov voľne žijúcich zvierat. Absentujú, resp. sú nedostatočne seriózne prehľady o výskyte mykobakteriálnych infekcií u všetkých kategórií voľne žijúcich zvierat, ako sú lovná zver, zvieratá z farmových chovov, predátori, voľne žijúce a migrujúce vtáctvo, rezervoárové zvieratá. Zdokumentované prípady však jednoznačne potvrdzujú význam niektorých voľne žijúcich zvierat napr. v epizootológii bovinnej tuberkulózy (jazvec vo Veľkej Británii, vačica na Novom Zélande, srnčia zver a rys v Španielsku), aviárnej tuberkulózy (voľne žijúce a migrujúce vtáctvo) a paratuberkulózy (jelenia a srnčia zver, muflón, lasica hranostaj, jazvec, králik – Španielsko, Anglicko, Škótsko).

V európskych podmienkach, vzhľadom na stále sa zmenšujúci životný priestor voľne žijúcich zvierat, je známy fenomén spoločnej pastvy hospodárskych zvierat a voľne žijúcich preživcov. Je evidentné, že sa jedná o nepriamy kontakt v prenose a následnom udržiavaní mykobakteriálnych (najmä paratuberkulózy) a iných infekcií.

V európskom priestore existuje vysoká miera presunov zvierat, najmä domácich a hospodárskych (obchod, turizmus a pod.). Existujú však aj presuny ilegálne, ktoré predstavujú vysoké riziko zavlečenia nákazy.

#### VÝZNAM ERADIKÁCIE BOVINNEJ TUBERKULÓZY

Konečná eradikácia bude predstavovať neoceniteľný prínos pre celú spoločnosť, pretože sa dosiahne eliminácia významnej zoonózy.

Bovinná tuberkulóza predstavuje najväčšiu hrozbu a obmedzenie pre udržanie a trvalý rozvoj chovu hovädzieho dobytku v Únii.

Komplexnosť vnútorného trhu, konkurencieschopnosť v zahraničnom obchode s hovädzím dobytkom a produk-

tami je v záujme celej európskej spoločnosti.

#### HLAVNÝ CIEĽ EÚ – ERADIKÁCIA

EÚ nepodporuje primárne len programy tlmenia, hlavným zámerom ekonomickej podpory je úplná eradikácia bovinnej tuberkulózy na území Únie.

Konečným cieľom je úplná eradikácia, prechodným cieľom je rýchle zvýšenie počtu chovov prostých bovinnej tuberkulózy. EÚ priznáva štátu „prostý bovinnej tuberkulózy“ nielen jednotlivým členským štátom Únie, ale aj jednotlivým regiónom vo vnútri týchto štátov ešte pred úplnou eradikáciou *M. bovis* na území EÚ.

#### POSILNENIE OPATRENÍ A KOMPETENCIÍ

Reprezentanti veterinárnych služieb členských krajín únie sú si vedomí, že prísny aplikovaním prijatých opatrení je možné toto ochorenie eradikovať. Práve veterinárne služby krajín s výskytom bovinnej tuberkulózy sú primárne zodpovedné za úspešnú eradikáciu. Veterinárne služby si však musia zachovať svoju silu, rozhodnosť a organizovanosť a súčasne musia disponovať s príslušnými právomocami a kompetenciami na úspešnú eradikáciu tejto nákazy. Štát musí pre to vytvoriť legislatívny rámec a ekonomické zdroje.

Úspech pri realizácii jednotlivých eradikačných programov v členských krajinách si vyžaduje spoločný a racionálny prístup všetkých zainteresovaných zložiek.

#### ZÁVER

Vývoj nových technológií a nové vedecké poznatky nám dávajú nové možnosti v diagnostike tejto významnej zoonózy akou je bovinná tuberkulóza (napr. Gama interferónový test, molekulárno-genetické metódy). Napriek týmto nesporným výhodám je dôležité zachovať racionálny prístup v ich použití v praktickom živote. Je dôležité si uvedomiť, že tieto nové možnosti tvoria úplnú nadstavbu diagnostiky mykobakteriálnych infekcií a nie je možné ani vhodné ich masové použitie ako základnej metodiky v stratégii eradikácie tuberkulózy.

Ako už bolo zdôraznené, vysoká angažovanosť a profesionalita jednotlivých veterinárnych služieb tvoria základ úspechu v tomto snažení spolu s osvedčenými spôsobmi chovu v jednotlivých regiónoch Únie.

Význam voľne žijúcich zvierat v epizootológii bovinnej tuberkulózy a iných mykobakteriálnych infekcií nie je dolo-

siať ani dostatočne poznaný, a tým ani dostatočne docenený. Je preto nutné venovať adekvátnu pozornosť týmto druhom zvierat zo strany profesionálov pracujúcich v tejto oblasti.

Na záver chceme zdôrazniť nasledujúce myšlienky:

1. Kožný alergický tuberkulínový test je oficiálnym testom pre bovinú tuberkulózu. Jeho správne vykonanie skúseným veterinárnym lekárom predstavuje nenahraditeľný diagnostický nástroj pri eradikácii a následnej surveillance bovinnej tuberkulózy v EÚ.

2. Kombinácia výsledkov inšpekcie mäsa na bitúnkoch a kožného alergického tuberkulínového testu re-

prezentujú ten najlepší metodický prístup k surveillance bovinnej tuberkulózy.

#### SUMMARY

ROMERO, B., BEZOS, J., ÁLVAREZ, J., ARANAZ, A., DE JUAN, L., LOZANO, F., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L., TRÁVNÍČEK, M.: Bovine tuberculosis in EU – the presence and future.

Different aspects of the control of bovine tuberculosis in EU such as climatological and ecological conditions, the size of herds and organization of breed, nutrition of animals are discussed in this article. Main principles of EU in eradication of bovine tuberculosis and basic legislative documents related with

this process are presented. Actual situation in human tuberculosis caused by *M. bovis* is presented. The list of officially tuberculosis free member countries and the list of countries with eradication programme co-financed by EU is also given. The control and eradication of bovine tuberculosis from different aspects like complexity, heterogeneity, the presence of reservoir animals and the movements of animals is discussed. Simple intradermal tuberculin test in combination with the inspection of meat in abattoirs represents the common approach to the eradication and control of this important zoonotic disease.

Lektor: Břeš, J., ŠVPS SR Bratislava

## EPIZOOTOLÓGIA A DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÁLNYCH INFEKCIÍ Časť II. Paratuberkulóza

de Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Bezos, J., Romero, B., Rufián, L., Mateos, A., Domínguez, L., Trávníček, M.\*

Veterinárná fakulta Univerzity Complutense, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Španielsko

\*Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 040 81 Košice, Slovenská republika

Vzhľadom na význam a dôležitosť mykobakteriálnych infekcií a snahu o eradikáciu paratuberkulózy hospodárskych a iných zvierat v EÚ sa oživil záujem o túto problematiku vo väčšine členských krajín Únie. ŠVPS SR reagovala na túto situáciu vypracovaním „Plánu kontroly a eradikácie paratuberkulózy na Slovensku“, ktorý bol publikovaný v *Slov. vet. čas.*, 30, 2005, 4, 221–223, čím vytvorila legislatívny rámec a určila stratégiu pri tlení tejto nákazy.

Veterinárná fakulta Univerzity Complutense v Madride sa v r. 2004 stala koordinačným pracoviskom pre európsku sieť laboratórií zaoberajúcich sa problematikou mykobakteriálnych infekcií v širokom kontexte ako sú: klinická a laboratórna diagnostika, výskum a vývoj nových diagnostických metód a biopreparátov, aplikácia rôznych stratégií pri tlení a eradikácii tuberkulózy a paratuberkulózy, výskyt mykobakteriálnych infekcií u voľne žijúcich zvierat atď. Niektoré informácie, ktoré prináša tento článok sú známe, niektoré predstavujú nové, aktuálne možnosti ich použitia v tejto oblasti vo veterinárnej medicíne.

Vytvorenie multidisciplinárnej siete laboratórií pre oblasť mykobakteriál bolo motivované nasledujúcimi dôvodmi

#### • *Mycobacterium avium* complex

*M. a. paratuberculosis*

*M. a. avium*

*M. a. hominissuis*

*M. a. sylvaticum*

*M. intracellulare*

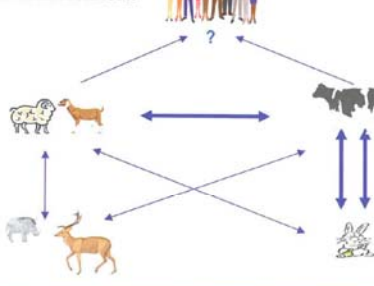


Paratuberkulóza

Aviárna tuberkulóza

Obr. 1 Komplex *Mycobacterium avium* – *Mycobacterium avium* complex

#### Paratuberkulóza



Obr. 2 Epizootologický proces paratuberkulózy – Epizootic process of paratuberculosis

### Antibiogramme of *M. bovis* and *M. caprae* isolates of animal origin.

Romero B.<sup>1</sup>, Rodríguez S.<sup>1</sup>, Álvarez J.<sup>1</sup>, Aranaz A.<sup>1</sup>, de Juan L.<sup>1</sup>, Mateos A.<sup>1</sup>, Gómez-Mampaso E.<sup>2</sup> and Domínguez L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid,

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, Madrid. Spain. Email:

[bromerom@vet.ucm.es](mailto:bromerom@vet.ucm.es)

*Mycobacterium bovis* and *M. caprae* are the main causative agents of animal tuberculosis, infecting many domestic and wild animal species but also human beings. An additional danger would arise if the strains involved in an outbreak become resistant to one or several antibiotics, which would complicate the treatment of the patients.

Due to this concern, the target of this study was to determine the drug susceptibility of *M. bovis* and *M. caprae* isolates from animal origin. Moreover, we sequenced the main genes involved in antibiotic resistance in the *M. tuberculosis* complex.

Thirty-two *M. bovis* and three *M. caprae* isolates were tested for susceptibility to isoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomycin (STR), ethambutol (EMB) and ofloxacin (OFX) by the standard proportion method in Middlebrook medium without (M) and with sodium pyruvate (M-pyr). We also sequenced the *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC* intergenic region, *rpoB*, *rrs*, *rpsL*, *embB* and *gyrA* genes.

Despite some isolates showed nucleotide substitutions in several genes involved in resistance, all the isolates were sensitive to RIF, STR, EMB and OFX. Related to INH, the results revealed an interference caused by pyruvate, producing greater interference at lower INH concentration in M-pyr medium. However, pyruvate was essential for *M. bovis* culture. In M control tubes, the 34.3% of isolates failed to grow, whereas the growth of the other isolates was poorer and slower than in tubes with pyruvate.

The mutations found in the isolates were not involved in drug resistance because all the *M. bovis* and *M. caprae* isolates successfully tested were sensitive. Moreover, the susceptibility of *M. bovis* to INH cannot be determined reliably using the proportion method in M-pyr medium because pyruvate interferes with INH.





Un lugar para la ciencia  
y la tecnología

**Seguridad Alimentaria y Alimentación**  
 Weblog gestionado por el Programa Vigilancia Sanitaria

BLOGS **madi+d**

PORTADA BLOG

GALERIAS IMAGENES

## Tuberculosis en España

Publicado por **Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)** el 30 Marzo, 2007 [Comentarios \(56\)](#) [Editar](#)

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa reemergente que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial (2.200 millones de personas), causando 1,6 millones de muertes anuales. El principal agente etiológico de esta enfermedad en humanos es *Mycobacterium tuberculosis*, transmitida fundamentalmente por vía aerógena produciendo lo que se denomina "tuberculosis pulmonar". Sin embargo, una de las formas más importantes de esta enfermedad a escala global es zoonótica, es decir, una infección transmitida desde los animales al hombre.

Otras bacterias del mismo grupo pueden producir la enfermedad, como *M. bovis* o *M. caprae* aunque son patógenos propios de animales, principalmente de ganado bovino y caprino. La transmisión es en estos casos mediante la ingesta de alimentos infectados, produciendo una "tuberculosis digestiva", siendo ésta vía mucho menos frecuente.

Actualmente España es, junto con Portugal, el país más afectado de la Unión Europea por esta enfermedad. Según la **Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)**, se registran 10.000 nuevos casos anuales a pesar de existir programas de control de la enfermedad. El perfil de los pacientes infectados por *M. tuberculosis* es muy diverso, afectando principalmente a inmunodeprimidos (portadores VIH), indigentes o inmigrantes procedentes de países en vías de desarrollo. También el personal sanitario y los cooperantes que trabajan en zonas de alta prevalencia de la enfermedad son un grupo de riesgo a tener en cuenta.

En España, la prevalencia de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis*, es inferior al 0,8 %, sin duda gracias a la implantación de Programas Nacionales de Erradicación de la Tuberculosis en ganado bovino, que se llevan a cabo desde finales de los años 70 y que obligan al sacrificio de animales positivos a las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis (intradermotuberculinización y gamma-interferón). Debido a este sistema de vigilancia y control, la prevalencia de tuberculosis en ganado bovino de un 1,8%, reduciendo el riesgo de transmisión de la enfermedad al hombre a través de los alimentos. Por lo tanto, la transmisión de la tuberculosis bovina al hombre estaría producida básicamente por el contacto directo con animales infectados, como por ejemplo ganaderos y veterinarios. Si a principios de siglo y hasta bien entrado el primer tercio, la tuberculosis "bovina" o digestiva en el hombre era importante en términos cuantitativos en España, hoy en día la tuberculosis bovina zoonótica afecta esencialmente a países en vías de desarrollo con infraestructuras sanitarias deficientes o inexistentes, en las que es una más de las infecciones concurrentes que devastan sus poblaciones. La vía de contagio digestiva es una característica diferencial, en términos genéricos para esta forma de la tuberculosis por contraposición a la tuberculosis pulmonar por *M. tuberculosis*.

En definitiva, la tuberculosis humana es un problema que parecía en vías de eliminación hace dos décadas pero que ha resurgido con una fuerza inusitada. En nuestro país, por desgracia, es una infección mucho más común de lo que correspondería a los niveles de atención sanitaria disponibles, pero, en todo caso, no se trata de una enfermedad que deba ser asociada a los animales ni a los alimentos de ellos derivados, sino a cuestiones de índole social y sanitaria.

El **Laboratorio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)** posee un grupo especializado destinado a la investigación de las enfermedades producidas por micobacterias en animales. Así mismo, colabora con distintas comunidades autónomas en la realización de campañas de saneamiento ganadero, incluyendo la realización e interpretación de pruebas de diagnóstico, la recomendación del sacrificio de animales enfermos o sospechosos, la recogida de muestras tisulares en el matadero y la realización del cultivo bacteriológico e identificación molecular de la o las micobacterias implicadas. También colabora con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la asesoría científica y técnica del personal de laboratorio de las distintas comunidades autónomas, incluyendo principalmente la formación en la realización de la prueba de detección de gamma-IFN y análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

Beatriz Romero Martínez  
 Servicio de Micobacterias  
 Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)  
 Universidad Complutense

Buscar

Buscar en el blog...



Programa I+D de la Comunidad de Madrid



Vigilancia Sanitaria  
Programa I+D financiado por la Comunidad

### Entradas recientes

- > Comentario sobre la opinión expresada por la EFSA Q
- > SCIENTX: The community for science education in
- > Los biofilms en la industria alimentaria
- > Prevalencia de Campylobacter y Salmonella en pollos Europea
- > La EFSA y el ECDC emiten su informe anual sobre brotes de origen alimentario en la UE

### Acceso usuarios

[Administración](#)  
[Cerrar sesión](#)

**Caracterización molecular de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante espoligotipado y MIRU-VNTR**

**Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by spoligotyping and MIRU-VNTR**

Romero B.<sup>1</sup>, Bezos J.<sup>1,2</sup>, Rodríguez S.<sup>1</sup>, Álvarez N.<sup>1</sup>, Moya N.<sup>1</sup>, Aranaz A.<sup>1,2</sup>, Domínguez L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, 28040, Madrid, España

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040, Madrid, España

**Introducción.** La caracterización molecular es una herramienta básica para realizar estudios epidemiológicos. El espigotipado es la técnica de caracterización molecular de primera línea de *Mycobacterium bovis*/*M. caprae*. Sin embargo, sólo se limita al estudio de 43 espaciadores del locus DR. Actualmente, el uso de los marcadores MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat) está en auge debido a su excelente grado de discriminación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la discriminación de ambas técnicas en aislados de *M. bovis*/*M. caprae*.

**Material y Métodos.** Seleccionamos un panel de aislados de *M. bovis* (n=41) y *M. caprae* (n=5), (44 no relacionadas epidemiológicamente), procedentes de animales domésticos y salvajes en España. Todas las cepas fueron caracterizadas mediante la técnica de espigotipado (4) y mediante ocho marcadores MIRU-VNTR considerados polimórficos (1, 5): VNTR 3232, VNTR 2165, VNTR 2461, VNTR 4052, VNTR 2163a, VNTR 2163b, VNTR 0580, VNTR 0802. También realizamos el espigotipado usando espaciadores alternativos (espigotipado con segunda generación) (3). La discriminación ofrecida por cada técnica (D), aislada o en combinación, fue realizado mediante la ecuación descrita por Hunter y Gaston (2).

**Resultados.** Los 46 aislados fueron agrupados en 36 espigotipos (D=0,99), 15 patrones usando el espigotipo de segunda generación (D=0,79), y 34 perfiles MIRU-VNTR (D=0,99). Los marcadores MIRU-VNTR más discriminativos, en orden decreciente, fueron VNTR 3232, VNTR 2165, VNTR 4052, VNTR 2461, VNTR 2163a, VNTR 2163b. Los loci VNTR 0580 y VNTR 0802 ofrecieron escasa variabilidad genética en este estudio. Al combinar las tres técnicas la discriminación fue similar al número de cepas no relacionadas (n=43). Además, las especies *M. bovis* y *M. caprae* se diferenciaron genéticamente tanto por espigotipado como MIRU-VNTR. Los aislados agrupados en tres de los espigotipos más frecuentes en España (n=8) fueron diferenciados por la técnica MIRU-VNTR. Por otra parte realizamos análisis de los espaciadores del locus DR, ya que MIRU-VNTR agrupó espigotipos diferentes en el mismo clúster: en cuatro de los ocho casos hallamos una pérdida de espaciadores únicos o consecutivos de un espigotipo respecto a otro.

Discusión y conclusiones. El locus DR y los marcadores MIRU-VNTR son relojes genéticos que permiten realizar estudios epidemiológicos. En nuestro estudio, la variabilidad aportada por el espigotipado y la técnica MIRU-VNTR fue similar (36 y 34 perfiles, respectivamente), manteniéndose el 61,4% de los clústeres generados por ambas técnicas. La combinación de las mismas diferenció cepas incluidas dentro del mismo espigotipo pero sin ninguna relación epidemiológica. La estabilidad genética de MIRU-VNTR se presume superior al espigotipado gracias al estudio de los espaciadores del locus DR, en el que la delección de espaciadores está asociada a un mecanismo de microevolución.

#### Bibliografía.

1. Allix et al. 2006. J. Clin. Microbiol. 44: 1951-1962.
2. Hunter y Gaston. 1988. J. Clin. Microbiol. 26: 2465-2466.
3. Javed et al. 2007. Tuberculosis 87: 437-445.
4. Kamerbeek et al. 1997. J. Clin. Microbiol. 35: 907-914.
5. Skuce et al. 2002. Microbiology 148: 519-528.

## Proper Identification Of The Causative Agents Of Animal Mycobacteriosis For The Tuberculosis Eradication Programme

**Beatriz Romero**<sup>1,2</sup>, Javier Bezos<sup>1,2</sup>, Julio Álvarez<sup>1,2</sup>, Elena Castellanos<sup>1,2</sup>, Lucía de Juan<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Lozano<sup>1</sup>, Ana Mateos,<sup>1,2</sup> Alicia Aranaz<sup>1,2</sup>, Lucas Domínguez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, 28040, Madrid, España

<sup>2</sup> Animal Health Department, Veterinary Faculty, Universidad Complutense, 28040, Madrid, España

In Spain, bovine tuberculosis is still present in cattle and the proper identification of the pathogens isolated from the clinical samples is essential for the surveillance and tuberculosis control. The majority of the clinical isolates belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, mainly *Mycobacterium* (M.) *bovis* and *M. caprae*. PCR technique is widely used to identify and classify bacteria because of its simplicity, cost-effectiveness and performance.

A retrospective study of 2861 samples from cattle from all over Spain was done over a four-year period (2005-2008). All cattle were tuberculin positive and the samples consisted of organs (lung, liver) and/or lymph nodes (mediastinal, tracheobronchial, retropharyngeal, prescapular and/or mandibular lymph nodes). A macroscopic inspection of these samples was done to detect lesions compatible with tuberculosis. After the microbiological culture and the mycobacteria growth in specific solid media (Coletsos and Lowenstein Jensen with pyruvate), PCRs were performed to identify the *Mycobacterium* genus (ARNr 16S), the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) (MPB70), and the *Mycobacterium avium* complex (MAC) (ARNr 16s) and the subspecies *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *avium* (MAA) and *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) (LSPa17), following a predefined workflow scheme.

Approximately 94% of the samples with tuberculosis-like lesions were positive to MTBC by PCR. Moreover the 5% of the analyzed samples without lesions compatible with tuberculosis were also positive to MTBC. In contrast, only five isolates from tuberculosis-like lesions samples and 39 from animals without lesions were identified as *Mycobacterium* spp. Five of the latter were identified as MAC and afterwards they were classified as MAH.

The species identification of the isolates for surveillance of bovine tuberculosis is very important to confirm the animal infection. Although the main isolated species belong to the MTBC, it is occasionally identified non-tuberculosis mycobacteria. The study of these isolates should be taken into consideration and a monitoring of them should be done.



## References

1. Corner, L. A. and Trajstman, A. C. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* 18:127-134.
2. Cousins, D. V., Wilton, S. D., Francis, B. R. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 27:187-195.
3. Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., and Rychlik, I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J.Microbiol.Methods* 38:155-167
4. Semret, M., Turenne, C.Y., de Haas, P., Collins, D.M., Behr, M.A. 2006. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence.
5. Wilton, S. and Cousins, D. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1:269-273.

### **MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION IN CATTLE**

B. Romero<sup>1,2</sup>, S. Rodríguez<sup>1,2</sup>, L. de Juan<sup>1,2</sup>, E. Castellanos<sup>1,2</sup>, J. Bezos<sup>1,2</sup>, N. Moya<sup>1</sup>, F.J. Lozano<sup>1</sup>, O. Mínguez<sup>3</sup>, R. Díaz<sup>4</sup>, E. Fernández<sup>5</sup>, A. Mateos<sup>1,2</sup>, L. Domínguez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> VISAVET Health Surveillance Centre; <sup>2</sup> Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine. Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Dirección General de Producción Agropecuaria, Junta de Castilla y León, 47014 Valladolid, Spain

<sup>4</sup> Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio, 28012 Madrid, Spain

<sup>5</sup> Dirección General de Ganadería y Agroalimentación, Consejería de Medio Rural y Pesca, 33005 Oviedo, Spain

Contact: [sabrina.rodriguez@visavet.ucm.es](mailto:sabrina.rodriguez@visavet.ucm.es)

According to the EU Bovine Tuberculosis Task Force, bovine tuberculosis is the infection in cattle caused by any mycobacterial species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. However, *M. bovis* is considered the main etiological agent of the disease in animals. Tuberculosis in cattle due to the human pathogen, *M. tuberculosis*, is a rare event but the detection of this infection is increasing in countries where the prevalence of tuberculosis in humans is high.

In Spain, *M. tuberculosis* infection was detected in three cattle farms during compulsory skin test and/or bacteriological culture. Samples from lung and associated lymph nodes were taken at the abattoir and sent to the regional veterinary laboratories to confirm *M. tuberculosis* complex infection. Samples were cultured by the automated BACTEC™ MGIT™ 960 System. Identification and molecular characterization were done by PCR and spoligotyping (spolDB4 database).

Positive cultures were obtained by the liquid culture system, PCR classified all isolates as members of the *M. tuberculosis* complex and spoligotyping identified three isolates as *M. tuberculosis*. They were only recovered from three animals (one from each farm) with three different spoligotypes (SIT58, SIT1564, SIT undetermined). In addition, *M. bovis* coexisted in a farm. A detailed epidemiological investigation was conducted and personnel closely related with the farms seemed to be the source of infection.

Although few *M. tuberculosis* have been isolated this infection is receiving attention in cattle due the risk of transmission to other animals or to humans. Moreover, the automated BACTEC™ MGIT™ 960 System is recommended for the isolation of *M. tuberculosis*.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abalos, P., Retamal, P. 2004. Tuberculosis: a re-emerging zoonosis? *Rev. Sci. Tech.* 23: 583-594.
- Abadi, S.H., Samea, G.A., Morlock, G., Cooksey, R.C. 2009. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J. Infect. Dis.*
- Abdala, A. 1998. Tuberculosis bovina. *Rep* 56: 26-30, Sancor.
- Abdelaal, A., El-Ghaffar, H.A., Zaghloul, M.H., El, M.N., Badran, E., Fathy, A. 2009. Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing: a randomized trial. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8: 4.
- Ahmed, N., Alam, M., Abdul, M.A., Asad, R.S., Cataldi, A., Cousins, D., Hasnain, S.E. 2003. Genome sequence based, comparative analysis of the fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLP) of tubercle bacilli from seals provides molecular evidence for a new species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Genet. Evol.* 2: 193-199.
- Alcaide, F., Benitez, M.A., Escribá, J.M., Martín, R. 2000. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/Bact systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J. Clin. Microbiol.* 38: 398-401.
- Alexander, K.A., Pleydell, E., Williams, M.C., Lane, E.P., Nyange, J.F., Michel, A.L. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 598-601.
- Alfonso, R., Romero, R.E., Diaz, A., Calderon, M.N., Urdaneta, G., Arce, J., Patarroyo, M.E., Patarroyo, M.A. 2004. Isolation and identification of mycobacteria in New World primates maintained in captivity. *Vet. Microbiol.* 98: 285-295.
- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M. 2006. Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1951-1962.
- Allix-Béguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S. 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2692-2699.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1785-1789.
- Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L. 2004a. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2602-2608.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1263-1273.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Cousins, D. 1998. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 61: 311-324.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Vidal, D., Domingo, M., González, O., Rodríguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., van Embden, J.D., Cousins, D. 1996a. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2734-2740.
- Aranaz, A., Liebana, E., Pickering, X., Novoa, C., Mateos, A., Dominguez, L. 1996b. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *Vet. Rec.* 138: 276-280.

- Aranaz, A., Romero, B., Montero, N., Álvarez, J., Bezos, J., de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L. 2004b. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain. J. Clin. Microbiol. 42: 5388-5391.
- Ashford, D.A., Whitney, E., Raghunathan, P., Cosivi, O. 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev. Sci. Tech. 20: 325-337.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 8: 924-937.
- Baena, A., Porcelli, S.A. 2009. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. Tissue Antigens 74: 189-204.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A.B., Torkko, P., Tortoli, E., Thomsen, V.O. 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2398-2402.
- Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M.C., Cole, S.T. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? Mol. Microbiol. 44: 9-19.
- Behr, M.A., Mostowy, S. 2007. Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. Curr. Mol. Med. 7: 309-317.
- Bemer, P., Palicova, F., Rusch-Gerdes, S., Dugeon, H.B., Pfyffer, G.E. 2002. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40: 150-154.
- Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., Drancourt, M. 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2803-2808.
- Bengis, R.G., Kock, R.A., Fischer, J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Rev. Sci. Tech. 21: 53-65.
- Bennett, R.M., Cooke, R.J. 2006. Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. Vet. Rec. 158: 429-432.
- Bergmann, J.S., Woods, G.L. 1998. Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculous drugs. J. Clin. Microbiol. 36: 2940-2943.
- Bernardelli, A., Bastida, R., Loureiro, J., Michelis, H., Romano, M.I., Cataldi, A., Costa, E. 1996. Tuberculosis in sea lions and fur seals from the south-western Atlantic coast. Rev. Sci. Tech. 15: 985-1005.
- Besser, R.E., Pakiz, B., Schulte, J.M., Alvarado, S., Zell, E.R., Kenyon, T.A., Onorato, I.M. 2001. Risk factors for positive mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. Pediatrics 108: 305-310.
- Biet, F., Boschirol, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36: 411-436.
- Blaas, S.H., Bohm, S., Martin, G., Erler, W., Gluck, T., Lehn, N., Naumann, L. 2003. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* SSP. *caprae* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47: 431-433.
- Blackwood, K.S., He, C., Gunton, J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., Kabani, A.M. 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 38: 2846-2852.
- Blázquez, J., Espinosa de los Monteros, L.E., Samper, S., Martín, C., Guerrero, A., Cobo, J., van Embden, J., Baquero, F., Gómez-Mampaso, E. 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. J. Clin. Microbiol. 35: 1390-1393.
- Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blöcker, H., Böttger, E.C. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 28: 1751-1759.

- Boisvert, H. 1970. Effect of pyruvic acid on mycobacterial growth and antibiograms. *Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris)* 34: 117-124.
- Boland, F., Kelly, G.E., Good, M., More, S.J. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 93: 153-161.
- Boniotti, M.B., Goria, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L. 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 47: 636-644.
- Bourne, F.J., Donnelly, C., Cox, D., Gettinby, G., McInerney, J., Morrison, I., Woodroffe, R. 2007. *Bovine TB: The Scientific Evidence, A Science Base for a Sustainable Policy to Control TB in Cattle, An Epidemiological Investigation into Bovine Tuberculosis*. Final Report of the Independent Scientific Group on Cattle TB. Department for Environment, Food and Rural Affairs.
- Bouvet, E., Casalino, E., Mendoza-Sassi, G., Lariven, S., Vallee, E., Pernet, M., Gottot, S., Vachon, F. 1993. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case-control study. *AIDS* 7: 1453-1460.
- Bouvier, G. 1963. Possible transmission of tuberculosis and brucellosis from game animals to man and to domestic animals. *Bulletin de l'office international des epizooties* 59: 433-436.
- Bouvier, G., Burgisser, H., Schweizer, R. 1957. Observations sur les maladies du gibier, des oiseaux et des poisons faites 1955 et 1956. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 99: 461-477.
- Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force. 2006. Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU accepted by the Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication. pp.1-14; [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/tb\\_workingdoc2006\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/tb_workingdoc2006_en.pdf).
- Brennan, M.J., Delogu, G. 2002. The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol.* 10: 246-249.
- Brennan, M.J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., Jacobs, W.R. Jr., 2001. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect. Immun.* 69: 7326-7333.
- Briones, V., de Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.I., Galka, M., Montero, N., Goyache, J., Aranaz, A., Domínguez, L. 2000. Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 189-191.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutiérrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 3684-3689.
- Brosch, R., Pym, A.S., Gordon, S.V., Cole, S.T. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 9: 452-458.
- Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajj, S.A., Allix, C., Aristimuno, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J.T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., García de Viedma, D., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H.M., Gutiérrez, M.C., Hawkey, P.M., van Helden, P.D., Kadival, G.V., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S.P., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M.L., Martín, C., Mokrousov, I., Narvskaja, O., Ngeow, Y.F., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolof-Razanamparany, V., Rasolonalana, T., Rossetti, M.L., Rusch-Gerdes, S., Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I.G., Singh, U.B., Somoskovi, A., Skuce, R.A., van Soolingen, D., Streicher, E.M., Suffys, P.N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T.C., Warren, R.M., Yap, S.F., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N., Sola, C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC. Microbiol.* 6: 23.



- Brudey, K., Gutiérrez, M.C., Vincent, V., Parsons, L.M., Salfinger, M., Rastogi, N., Sola, C. 2004. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. J. Clin. Microbiol. 42: 5053-5057.
- Bruning-Fann, C.S., Schmitt, S.M., Fitzgerald, S.D., Fierke, J.S., Friedrich, P.D., Kaneene, J.B., Clarke, K.A., Butler, K.L., Payeur, J.B., Whipple, D.L., Cooley, T.M., Miller, J.M., Muzo, D.P. 2001. Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. J. Wildl. Dis. 37: 58-64.
- Cadmus, S., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., Jahans, K., Hewinson, R.G., Gordon, S.V. 2006. Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. J. Clin. Microbiol. 44: 29-34.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soelingen, D. 2009. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. Emerg. Infect. Dis. 15: 2066-2067.
- Caimi, K., Romano, M.I., Alito, A., Zumárraga, M., Bigi, F., Cataldi, A. 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. J. Clin. Microbiol. 39: 1067-1072.
- Canetti, G., Fox, W., Khomenko, A., Mahler, H.T., Menon, N.K., Mitchison, D.A., Rist, N., Smelev, N.A. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull. World Health Organ 41: 21-43.
- Canetti, G., Rist, N., Grosset, J. 1963. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris) 27: 217-272.
- Carbonnelle, B., Carpentier, E., Bauriaud, R., Castets, M., Chippaux, C., Danjoux, M.F., Fisher, I., Gevaudan, M.J., Martín, C., Moinard, D. 1995. Use of the Bactec TB 460 method for the bacteriological diagnosis of tuberculosis. Results of a multicenter study. Pathol. Biol. (Paris) 43: 401-406.
- Castets, M., Rist, N., Boisvert, H. 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. Médecine d'Afrique Noire 4: 321-322.
- Castets, M., Sarraf, H., 1969. Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note). Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lang Fr. 14: 693-696.
- Cave, M.D., Eisenach, K.D., McDermott, P.F., Bates, J.H., Crawford, J.T. 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol. Cell Probes 5: 73-80.
- Cavirani, S., Fanti, F., Benecchi, M., Calderaro, A., Taddei, S., Arcangeletti, C., Medici, M.C., Dettori, G., Chezzi, C. 2003. Evaluation of susceptibility of *Mycobacterium bovis* to antituberculous drugs by radiometric BACTEC 460TB system. New Microbiol. 26: 181-186.
- Centers for Diseases Control and Prevention, 2005. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001-2004. MMWR 54: 605-608.
- Charlet, D., Mostowy, S., Alexander, D., Sit, L., Wiker, H.G., Behr, M.A., 2005. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. Mol. Microbiol. 56: 1302-1313.
- Chen, Y., Chao, Y., Deng, Q., Liu, T., Xiang, J., Chen, J., Zhou, J., Zhan, Z., Kuang, Y., Cai, H., Chen, H., Guo, A. 2009. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. Tuberculosis. (Edinb.) 89: 95-100.
- Clausen, B., Korsholm, H. 1991. A survey for tuberculosis in freeliving red deer (*Cervus elaphus*) from Jutland, Denmark. Dansk Veterinaertidsskrift 74: 245-248.
- Clercx, C., Coignoul, F., Jakovljevic, S., Balligand, M., Mainil, J., Henroteaux, M., Kaeckenbeeck, A. 1992. Tuberculosis in dogs: a case report and review of the literature. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 28: 207-211.
- Cobo, J., Asensio, A., Moreno, S., Navas, E., Pintado, V., Oliva, J., Gómez-Mampaso, E., Guerrero, A. 2001. Risk factors for nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 5: 413-418.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? Annu. Rev. Microbiol. 56: 457-487.

- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. III, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Collins, C.H. 2000. The bovine tubercle bacillus. *Br. J. Biomed. Sci.* 57: 234-240.
- Collins, C.H., Yates, M.D., Grange, J.M. 1982. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J. Hyg. (Lond)* 89: 235-242.
- Collins, D.M. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis. (Edinb.)* 81: 97-102.
- Collins, D.M., Erasmuson, S.K., Stephens, D.M., Yates, G.F., de Lisle, G.W. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1143-1147.
- Collins, D.M., Stephens, D.M. 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 11-15.
- Corner, L.A. 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 112: 303-312.
- Corner, L.A., Nicolacopoulos, C. 1988. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Aust. Vet. J.* 65: 202-205.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* 18: 127-134.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59-70.
- Costello, E., Flynn, O., Quigley, F., O'Grady, D., Griffin, J., Clegg, T., McGrath, G. 2006. Genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers in four areas of the Republic of Ireland by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vet. Rec.* 159: 619-623.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J. 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3217-3222.
- Cousins, D., Williams, S., Liébana, E., Aranaz, A., Bunschoten, A., van Embden, J., Ellis, T. 1998a. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 168-178.
- Cousins, D.V. 1995. Tuberculosis in seals in Australia. In: Australian Association of Veterinary conservation Biologist (AAVCB) (Ed.), In Proceedings of the Australian Veterinary Association Conference. Melbourne, Australia, pp. 51-57.
- Cousins, D.V. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech.* 20: 71-85.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumárraga, M., Bernardelli, A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1305-1314.
- Cousins, D.V., Dawson, D.J. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3: 715-721.
- Cousins, D.V., Peet, R.L., Gaynor, W.T., Williams, S.N., Gow, B.L. 1994. Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 42: 135-145.

- Cousins, D.V., Skuce, R.A., Kazwala, R.R., van Embden, J.D. 1998b. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2: 471-478.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P., Gales, N. 1993. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. Aust. Vet. J. 70: 92-97.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de la Rua-Domenech, R. 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. Vet. Rec. 163: 127.
- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B.K., Vickovic, I., 2007. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 11: 652-658.
- Daly, M., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Schooley, A., Berry, D.E., Kaneene, J.B. 2006. Patterns of antimicrobial susceptibility in Michigan wildlife and bovine isolates of *Mycobacterium bovis*. J Vet. Diagn. Invest 18: 401-404.
- Dankner, W.M., Davis, C.E. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. Pediatrics 105: E79.
- Dankner, W.M., Waecker, N.J., Essey, M.A., Moser, K., Thompson, M., Davis, C.E. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine (Baltimore) 72: 11-37.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. Science 287: 443-449.
- Dauendorffer, J.N., Guillemin, I., Aubry, A., Truffot-Pernot, C., Sougakoff, W., Jarlier, V., Cambau, E. 2003. Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. J. Clin. Microbiol. 41: 1311-1315.
- Davis, M. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* risk for elephant handlers and veterinarians. Appl. Occup. Environ. Hyg. 16: 350-353.
- de Kantor, I.N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Silva Telles, M.A., Ribeiro, M.O., Garzón Torres, M.C., Polo, C.L., Ribon, W., García, V., Kuffo, D., Asencios, L., Vásquez Campos, L.M., Rivas, C., de Waard, J.H., 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis. (Edinb.) 88 358-365.
- de Kantor, I.N., Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet. Microbiol. 112 111-118.
- de la Rua-Domenech, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis. (Edinb.) 86 77-109.
- de Vos, V., Bengis, R.G., Kriek, N.P., Michel, A., Keet, D.F., Raath, J.P., Huchzermeyer, H.F., 2001. The epidemiology of tuberculosis in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park, South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 68: 119-130.
- Dean, R., Gunn-Moore, D., Shaw, S., Harvey, A. 2006. Bovine tuberculosis in cats. Vet. Rec. 158: 419-420.
- Delahay, R.J., de Leeuw, A.N., Barlow, A.M., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L. 2002. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: a review. Vet. J. 164: 90-105.
- Delahay, R.J., Smith, G.C., Barlow, A.M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L. 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. Vet. J. 173: 287-301.
- Dobson, A., Meagher, M. 1996. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. Ecology 77: 1026-1036.

- Drobniewski, F., Rusch-Gerdes, S., Hoffner, S. 2007. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)–report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Clin. Microbiol. Infect. 13: 1144-1156.
- Drobniewski, F., Strutt, M., Smith, G., Magee, J., Flanagan, P. 2003. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. Epidemiol. Infect. 130: 235-237.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A. 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. Vet. Microbiol. 130: 415-421.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M.V., Botelho, A. 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. Vet. Microbiol. 143:299-306.
- Dye, C. 2006. Global epidemiology of tuberculosis. Lancet 367: 938-940.
- Dye, C., Lonnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B.G., Raviglione, M. 2009. Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries. Bull. World Health Organ 87: 683-691.
- Ellis, M.D., Davies, S., McCandlish, I.A., Monies, R., Jahans, K., Rua-Domenech, R. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. Vet. Rec. 159: 46-48.
- Emmanuel, F.X., Seagar, A.L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I. 2007. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg. Infect. Dis. 13: 1924-1927.
- Erler, W., Martín, G., Sachse, K., Naumann, L., Kahlau, D., Beer, J., Bartos, M., Nagy, G., Cvetnic, Z., Zolnir-Dovc, M., Pavlik, I. 2004. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. J Clin. Microbiol. 42: 2234-2238.
- Erwin, P.C., Bemis, D.A., McCombs, S.B., Sheeler, L.L., Himelright, I.M., Halford, S.K., Diem, L., Metchock, B., Jones, T.F., Schilling, M.G., Thomsen, B.V. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. Emerg. Infect. Dis. 10: 2258-2260.
- Espinosa de los Monteros, L.E., Galán, J.C., Gutiérrez, M., Samper, S., García Marín, J.F., Martín, C., Domínguez, L., de Rafael, L., Baquero, F., Gómez-Mampaso, E., Blázquez, J. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. J. Clin. Microbiol. 36: 239-242.
- Etchechoury, I., Valencia, G.E., Morcillo, N., Sequeira, M.D., Imperiale, B., Lopez, M., Caimi, K., Zumarraga, M.J., Cataldi, A., Romano, M.I. 2009. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First Description of a Person-to-Person Transmission Case. Zoonoses Public Health.
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. 2010. Tuberculosis surveillance in Europe 2008. European Centre for Disease Prevention and Control pp. 1-136. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/78856/E93600.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/78856/E93600.pdf).
- European Food Safety Authority. 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. The EFSA Journal 1496: 1-288; <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1496.pdf>.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P.M., Sonnenberg, P. 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. Lancet 369: 1270-1276.
- Fang, Z., Forbes, K.J. 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. J. Clin. Microbiol. 35: 479-481.
- Fang, Z., Morrison, N., Watt, B., Doig, C., Forbes, K.J. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. J. Bacteriol. 180: 2102-2109.

- Fanning, A., Edwards, S. 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *Lancet* 338: 1253-1255.
- Fetene, T., Kebede, N., Alem, G. 2009. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Ethiopia. *Zoonoses. Public Health*.
- Forshaw, D., Phelps, G.R. 1991. Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. *J. Wildl. Dis.* 27: 288-295.
- Francis, J. 1947. Bovine tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. Staples Press Ltd., London.
- Francis, J. 1973. Very small public health risk from flesh of tuberculosis cattle. *Aust. Vet. J.* 49: 496-497.
- Frigui, W., Bottai, D., Majlessi, L., Monot, M., Josselin, E., Brodin, P., Garnier, T., Gicquel, B., Martín, C., Leclerc, C., Cole, S.T., Brosch, R. 2008. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *Plos Pathog.* 4: e33.
- Fröta, C.C., Hunt, D.M., Buxton, R.S., Rickman, L., Hinds, J., Kremer K., van Soolingen, D., Colston, M.J. 2004. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology* 150: 1519-1527.
- Frothingham, R. 1995. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 33: 840-844.
- Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W.A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144: 1189-1196.
- Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S. 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69(3), 203-217.
- Garattini, S., Leonardi, A. 1954. Mechanism of action of isoniazid: relations with the pyruvic acid of the mycobacterial. *G. Ital. Chemioter.* 1: 281-288.
- García de Viedma, D., Marín, M., Ruiz Serrano, M.J., Alcalá, L., Bouza, E. 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J. Infect. Dis.* 187: 695-699.
- García-Pelayo, M.C., Caimi, K.C., Inwald, J.K., Hinds, J., Bigi, F., Romano, M.I., van Soolingen, D., Hewinson, R.G., Cataldi, A., Gordon, S.V. 2004. Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 family antigens. *Tuberculosis (Edinb.)* 84: 159-166.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 7877-7882.
- Giannoni, F., Lona, E., Sementilli, F., Brunori, L., Pardini, M., Migliori, G.B., Orefici, G., Fattorini, L. 2005. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2928-2933.
- Ginsburg, A.S., Grosset, J.H., Bishai, W.R. 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect. Dis.* 3: 432-442.
- Glawischnig, W., Allerberger, F., Messner, C., Schonbauer, M., Prodinger, W.M. 2003. Tuberculosis in free-living red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the northern Alps. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90: 38-40.
- Glennon, M., Smith, T., Cormican, M., Noone, D., Barry, T., Maher, M., Dawson, M., Gilmartin, J.J., Gannon, F. 1994. The ribosomal intergenic spacer region: a target for the PCR based diagnosis of tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* 75: 353-360.

- Goh, K.S., Rastogi, N. 1991. Rapid preliminary differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex: proposition of a radiometric method. *Res. Microbiol.* 142: 659-665.
- Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 81: 23-41.
- Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32: 643-655.
- Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S.T., Hewinson, R.G. 2001. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 81: 157-163.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.* 112: 171-179.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J. 2008. Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS. ONE.* 3: e2776.
- Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernández de Mera, I.G., Gavin, P., Juste, R.A., Martín, C., Acevedo, P., de la Puente, M., Hofle, U. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet. Res.* 36: 43-52.
- Goyal, M., Young, D., Zhang, Y., Jenkins, P.A., Shaw, R.J. 1994. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 32: 3070-3071.
- Grange, J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb.)* 81: 71-77.
- Grange, J.M., Gibson, J., Osborn, T.W., Collins, C.H., Yates, M.D. 1983. What is BCG? *Tubercle.* 64: 129-139.
- Grange, J.M., Yates, M., de Kantor, I. 1996. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second edition. World Health Organization.
- Grange, J.M., Yates, M.D. 1989. Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-87. *Epidemiol. Infect.* 103: 127-132.
- Grange, J.M., Yates, M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40: 137-151.
- Greth, A., Flamand, J.R., Delhomme, A. 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): management. *Vet. Rec.* 134: 165-167.
- Griffin, J.M., Williams, D.H., Kelly, G.E., Clegg, T.A., O'Boyle, I., Collins, J.D., More, S.J. 2005. The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 67: 237-266.
- Groenen, P.M., Bunschoten, A.E., van Soolingen, D., van Embden, J.D. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 10: 1057-1065.
- Guerrero, A., Cobo, J., Fortún, J., Navas, E., Quereda, C., Asensio, A., Cañón, J., Blázquez, J., Gómez-Mampaso, E. 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 350: 1738-1742.
- Gunn-Moore, D.A., Jenkins, P.A., Lucke, V.M. 1996. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec.* 138: 53-58.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Gavigan, J.A., García Marín, J.F., Martín, C. 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2953-2956.

- Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M.S., van Embden, J.D., Marín, J.F., Martín, C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin. Microbiol.* 35: 3328-3330.
- Gutiérrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vicent, V. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathog.* 1: e5.
- Haas, W.H., Bretzel, G., Amthor, B., Schilke, K., Krommes, G., Rusch-Gerdes, S., Sticht-Groh, V., Bremer, H.J. 1997a. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. *J. Clin. Microbiol.* 35: 663-666.
- Haas, W.H., Schilke, K., Brand, J., Amthor, B., Weyer, K., Fourie, P.B., Bretzel, G., Sticht-Groh, V., Bremer, H.J. 1997b. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1601-1603.
- Hackendahl, N.C., Mawby, D.I., Bemis, D.A., Beazley, S.L. 2004. Putative transmission of *Mycobacterium tuberculosis* infection from a human to a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225: 1573-1577.
- Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M.F., Hughes, S.L., Inwald, J., Hewinson, R.G., Durand, B. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin. Microbiol.* 39: 3623-3632.
- Hanna, B.A., Ebrahimzadeh, A., Elliott, L.B., Morgan, M.A., Novak, S.M., Rusch-Gerdes, S., Acio, M., Dunbar, D.F., Holmes, T.M., Rexer, C.H., Savthyakumar, C., Vannier, A.M. 1999. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37: 748-752.
- Hardie, R.M., Watson, J.M. 1992. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 109: 23-33.
- Hart, P.D., Sutherland, I. 1977. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br. Med. J.* 2: 293-295.
- Hawthorne, V.M., Lauder, I.M. 1962. Tuberculosis in man, dog, and cat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 85: 858-869.
- Hermans, P.W., van Soolingen, D., Bik, E.M., de Haas, P.E., Dale, J.W., van Embden, J.D. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59: 2695-2705.
- Hermans, P.W., van Soolingen, D., Dale, J.W., Schuitema, A.R., McAdam, R.A., Catty, D., van Embden, J.D. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2051-2058.
- Hermans, P.W., van Soolingen, D., van Embden, J.D. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol.* 174: 4157-4165.
- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Pena, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixido, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, M. 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev. Vet. Med.* 74(2-3), 239-247.
- Herr, H.W., Morales, A. 2008. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J. Urol.* 179: 53-56.
- Herrera, D., Cano, R., Godoy, P., Peiro, E.F., Castell, J., Ibáñez, C., Martínez-Navarro, F., Moreno, V., Ortega, A., Sánchez, L., Durán, R., Pozo, F. 1996. Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak on an HIV Ward--Madrid, Spain, 1991-1995. *MMWR* 45: 330-333.

- Hines, N., Payeur, J.B., Hoffman, L.J. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest* 18: 243-250.
- Hlavsa, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., Crawford, J.T., LoBue, P.A. 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin. Infect. Dis.* 47: 168-175.
- Honore, N., Cole, S.T. 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 238-242.
- Hood, D.W., Deadman, M.E., Jennings, M.P., Bisercic, M., Fleischmann, R.D., Venter, J.C., Moxon, E.R. 1996. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 11121-11125.
- Hoop, R.K., Bottger, E.C., Pfyffer, G.E. 1996. Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *J. Clin. Microbiol.* 34: 991-992.
- Huard, R.C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D., Ho, J.L. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 188: 4271-4287.
- Hughes, V.M., Skuce, R., Doig, C., Stevenson, K., Sharp, J.M., Watt, B. 2003. Analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* from three clinical samples from Scotland. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7: 1191-1198.
- Huitema, H., Jaartsveld, F.H. 1967. *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 33: 209-212.
- Hunter, P.R. 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1903-1905.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, K., Portaels, F., Swings, J. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3675-3680.
- Javed, M.T., Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Álvarez, J., Lozano, C., Mateos, A., Domínguez, L. 2007. Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 437-445.
- Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A. 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 71-76.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35: 907-914.
- Kanchana, M.V., Cheke, D., Natyshak, I., Connor, B., Warner, A., Martin, T. 2000. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for the recovery of mycobacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 31-36.
- Karlson, A.G., Lessel, E.F. 1970. *Mycobacterium bovis* nom.nov. *Int J. Syst. Bacteriol.* 20: 273-282.
- Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38: 301-308.
- Keating, L.A., Wheeler, P.R., Mansoor, H., Inwald, J.K., Dale, J., Hewinson, R.G., Gordon, S.V. 2005. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Mol. Microbiol.* 56(1), 163-174.



- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., van Soolingen, D., Koeter, G. 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J. Tuberc. Lung Dis.* 12: 1469-1473.
- Kocagoz, T., Hackbarth, C.J., Unsal, I., Rosenberg, E.Y., Nikaido, H., Chambers, H.F. 1996. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1768-1774.
- Koch, R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. *Berliner klinische Wochenschrift* 19: 221-230.
- Koller-Jones, M.A. 2010. National Bovine Tuberculosis (TB) Eradication Program. Canadian Food Inspection Agency, pp. 1-16.
- Konno, K., Feldmann, F.M., McDermott, W. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95: 461-469.
- Kraus, E. 1942. Examination for tubercle bacilli in wastewater from TB sanatorium. *Arch. Hyg.* 128: 112-122.
- Kremer, K., Arnold, C., Cataldi, A., Gutiérrez, M.C., Haas, W.H., Panaiotov, S., Skuce, R.A., Supply, P., van der Zanden, A.G., van Soolingen, D. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5628-5638.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakus, M.A., Musser, J.M., van Embden, J.D. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2607-2618.
- Kremer, K., van Soolingen, D., van Embden, J., Hughes, S., Inwald, J., Hewinson, G., 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2793-2794.
- Krishnan, M.Y., Radhakrishnan, I., Joseph, B.V., Madhavi Latha, G.K., Ajay, K.R., Mundayoor, S. 2007. Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Infect. Dis.* 7, 86.
- Krüner, A., Yates, M.D., Drobniewski, F.A. 2006. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 811-818.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3070-3077.
- LaBombardi, V.J. 2002. Comparison of the ESP and BACTEC systems for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates to pyrazinamide. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2238-2239.
- Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.L., Vergnaud, G. 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC. Microbiol.* 2: 37.
- Lee, H., Park, H.J., Cho, S.N., Bai, G.H., Kim, S.J. 2000. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2966-2971.
- Légrand, E., Filliol, I., Sola, C., Rastogi, N., 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1595-1599.
- Leite, C.Q., Anno, I.S., Leite, S.R., Roxo, E., Morlock, G.P., Cooksey, R.C. 2003. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 319-323.

- Lemaitre, N., Sougakoff, W., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V. 1999. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1761-1763.
- Lesslie, I.W. 1960. Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus. *Vet. Rec.* 72: 218-224.
- Levison, M.E. 2008. *Mycobacterium bovis*: An Underappreciated Pathogen. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10: 444-446.
- Lewerin, S.S., Olsson, S.L., Eld, K., Roken, B., Ghebremichael, S., Koivula, T., Kallenius, G., Bolske, G. 2005. Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet. Rec.* 156: 171-175.
- Liébana, E., Aranaz, A., Domínguez, L., Mateos, A., González-Llamazares, O., Rodríguez-Ferri, E.F., Domingo, M., Vidal, D., Cousins, D. 1997. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet. Microbiol.* 54: 223-233.
- Liébana, E., Aranaz, A., Urquía, J.J., Mateos, A., Domínguez, L. 1998. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust. Vet. J.* 76(1), 50-53.
- Liss, G.M., Wong, L., Kittle, D.C., Simor, A., Naus, M., Martiquet, P., Misener, C.R. 1994. Occupational exposure to *Mycobacterium bovis* infection in deer and elk in Ontario. *Can. J. Public Health* 85: 326-329.
- Littin, K.E., Mellor, D.J. 2005. Strategic animal welfare issues: ethical and animal welfare issues arising from the killing of wildlife for disease control and environmental reasons. *Rev. Sci. Tech.* 24 767-782.
- Liu, S., Weitzman, I., Johnson, G.G. 1980. Canine tuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 164-167.
- LoBue, P. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In: Thoen, C., Steele, J., Gilsdorf, M. (Eds.), *Public significance of Mycobacterium bovis*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 6-12.
- LoBue, P.A., Betancourt, W., Peter, C., Moser, K.S. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7(2), 180-185.
- LoBue, P.A., Betancourt, W., Cowan, L., Seli, L., Peter, C., Moser, K.S. 2004. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8: 1142-1146.
- Lomme, J.R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W., King, R.E. 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169: 912-914.
- Long, R., Nobert, E., Chomyc, S., van Embden, J., McNamee, C., Duran, R.R., Talbot, J., Fanning, A. 1999. Transcontinental spread of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 159: 2014-2017.
- Lu, D., Heeren, B., Dunne, W.M., 2002. Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 118: 542-545.
- Lumb, R., Bastian, I., Dawson, D., Gilpin, C., Havekort, F., Howard, P., Sievers, A. 2002. Tuberculosis in Australia: bacteriologically confirmed cases and drug resistance, 2000: report of the Australian Mycobacterium Laboratory Reference Network. *Commun. Dis. Intell.* 26: 226-233.
- Lutze-Wallace, C., Turcotte, C., Glover, G., Cousins, D., Bell, J., Berlie-Surujballi, G., Barbeau, Y., Randall, G. 2006. Isolation of a *Mycobacterium microti*-like organism from a rock hyrax (*Procavia capensis*) in a Canadian zoo. *Can. Vet. J.* 47: 1011-1013.
- Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik, I. 2003. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 and 2001. *Vet. Med. Czech* 48: 51-65.

- Magdalena, J., Supply, P., Locht, C. 1998a. Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 36: 2471-2476.
- Magdalena, J., Vachee, A., Supply, P., Locht, C. 1998b. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 36: 937-943.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178: 1274-1282.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95: 3140-3145.
- Malone, F.E., Wilson, E.C., Pollock, J.M., Skuce, R.A. 2003. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 50: 500-504.
- Manabe, Y.C., Scott, C.P., Bishai, W.R. 2002. Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 70: 1566-1570.
- Mankiewicz, E., Denuet, S. 1970. Commercially available Lowenstein-Jensen media. Can. J. Public Health 61: 251-252.
- Marianelli, C., Cifani, N., Capucchio, M.T., Fiasconaro, M., Russo, M., La, M.F., Pasquali, P., Di Marco, V. 2010. A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. J. Vet. Diagn. Invest 22: 445-448.
- Martín-Atance, P., León-Vizcaino, L., Palomares, F., Revilla, E., González-Candela, M., Calzada, J., Cubero-Pablo, M.J., Delibes, M. 2006. Antibodies to *Mycobacterium bovis* in wild carnivores from Donana National Park (Spain). J. Wildl. Dis. 42: 704-708.
- Martín-Hernando, M.P., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J., Gortázar, C. 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. Tuberculosis (Edinb.) 87: 360-367.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98: 1901-1906.
- McAdam, R., Selwyn, Q., Guilhot, C. 2000. Mycobacterial transposons and their applications. In: G.F.Hatfull and W.R.Jacobs,e. (Ed.), Molecular genetics of Mycobacteria. ASM Press, Wahington, D.C. USA., pp. 69-84.
- McAdam, R.A., Hermans, P.W., van Soolingen, D., Zainuddin, Z.F., Catty, D., van Embden, J.D., Dale, J.W. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol. Microbiol. 4: 1607-1613.
- McCallum, H., Hocking, B.A., 2005. Reflecting on ethical and legal issues in wildlife disease. Bioethics. 19: 336-347.
- Meier, A., Sander, P., Schaper, K.J., Scholz, M., Bottger, E.C. 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2452-2454.
- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. 160: 92-106.
- Meyer, S., Naumann, L., Landthaler, M., Vogt, T. 2005. *Lupus vulgaris* caused by *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae*. Br. J. Dermatol. 153: 220-222.
- Michalak, K., Austin, C., Diesel, S., Bacon, M.J., Zimmerman, P., Maslow, J.N. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. Emerg. Infect. Dis. 4: 283-287.

- Michel, A.L. 2002. Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969: 251-255.
- Michel, A.L., Bengis, R.G., Keet, D.F., Hofmeyr, M., Klerk, L.M., Cross, P.C., Jolles, A.E., Cooper, D., Whyte, I.J., Buss, P., Godfroid, J. 2006. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. *Vet. Microbiol.* 112: 91-100.
- Michel, A.L., Coetzee, M.L., Keet, D.F., Mare, L., Warren, R., Cooper, D., Bengis, R.G., Kremer, K., van Helden, P. 2009. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from free-ranging wildlife in South African game reserves. *Vet. Microbiol.* 133: 335-343.
- Michel, A.L., Hlokwé, T.M., Coetzee, M.L., Mare, L., Connaway, L., Rutten, V.P., Kremer, K. 2008. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Vet. Microbiol.* 126: 151-159.
- Michel, A.L., Muller, B., van Helden, P.D. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140: 371-381.
- Mignard, S., Pichat, C., Carret, G. 2006. *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1431-1433.
- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., van der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1505-1518.
- Millan-Suazo, F., Harris, B., Arriaga, D.C., Romero, T.C., Stuber, T., Alvarez, O.G., Morales, L.A., Perez, S.M., Payeur, J.B. 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Prev. Vet. Med.* 87: 261-271.
- Miller, L.P., Crawford, J.T., Shinnick, T.M. 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 805-811.
- Moda, G., Daborn, C.J., Grange, J.M., Cosivi, O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber. Lung Dis.* 77: 103-108.
- Mohamed, A.M., bou El-Ella, G.A., Nasr, E.A. 2009. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *J. Vet. Diagn. Invest* 21: 48-52.
- Mojica, F.J., Ferrer, C., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* 17: 85-93.
- Monies, B., de la Rua, R., Jahans, K. 2006. Bovine tuberculosis in cats. *Vet. Rec.* 158: 490-491.
- Monies, R.J., Cranwell, M.P., Palmer, N., Inwald, J., Hewinson, R.G., Rule, B. 2000. Bovine tuberculosis in domestic cats. *Vet. Rec.* 146: 407-408.
- Monreal, L., Segura, D., Segales, J., Garrido, J.M., Prades, M. 2001. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a mare. *Vet. Rec.* 149: 712-714.
- Montali, R.J., Mikota, S.K., Cheng, L.I., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev. Sci. Tech.* 20: 291-303.
- Morcillo, N., Zumárraga, M., Alito, A., Dolmann, A., Schouls, L., Cataldi, A., Kremer, K., van Soolingen, D. 2002. A low cost, home-made, reverse-line blot hybridisation assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 6: 959-965.
- Morgan, M., Kalantri, S., Flores, L., Pai, M. 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC. Infect. Dis.* 5: 62.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. 1995. Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 43: 256-265.

- Mostowy, S., Cousins, D., Behr, M.A. 2004a. Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 186: 104-109.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A., Behr, M.A. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* 186: 74-80.
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D., Behr, M.A. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 187: 6386-6395.
- Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond, E.P., Kato-Maeda, M., Behr, M. 2004b. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3594-3599.
- Mostowy, S., Tsolaki, A.G., Small, P.M., Behr, M.A. 2003. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 21: 4270-4274.
- Mueller, D.H., Mwenge, L., Muyoyeta, M., Muvwimi, M.W., Tembwe, R., McNerney, R., Godfrey-Faussett, P., Ayles, H.M. 2008. Costs and cost-effectiveness of tuberculosis cultures using solid and liquid media in a developing country. *Int J. Tuberc. Lung Dis.* 12: 1196-1202.
- Murcia, M.I., Tortoli, E., Menéndez, M.C., Palenque, E., García, M.J. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2049-2054.
- Musser, J.M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 496-514.
- Nagai, S., Matsumoto, J., Nagasuga, T. 1981. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 31: 1152-1160.
- Naranjo, V., Gortázar, C., Vicente, J., de la Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127: 1-9.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J., Hanna, J. 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet. Microbiol.* 28: 103-109.
- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40: 41-52.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rusch-Gerdes, S., Richter, E. 2000a. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3231-3234.
- Niemann, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S. 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 433-436.
- Niemann, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S. 2000b. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 152-157.
- Ninet, B., Monod, M., Emler, S., Pawlowski, J., Metral, C., Rohner, P., Auckenthaler, R., Hirschel, B. 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2531-2536.
- Nishi, J.S., Shury, T., Elkin, B.T. 2006. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: strategies for management and research. *Vet. Microbiol.* 112: 325-338.
- Nitta, A.T., Knowles, L.S., Kim, J., Lehnkering, E.L., Borenstein, L.A., Davidson, P.T., Harvey, S.M., De Koning, M.L. 2002. Limited transmission of multidrug-resistant tuberculosis despite a high proportion of infectious cases in Los Angeles County, California. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165: 812-817.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B. 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Prev. Vet. Med.* 54: 47-63.

- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Hickling, G.J. 2006. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. *Vet. Microbiol.* 112: 313-323.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis.* 76: 1-46.
- O'Shea, B., Khare, S., Bliss, K., Klein, P., Ficht, T.A., Adams, L.G., Rice-Ficht, A.C. 2004. Amplified fragment length polymorphism reveals genomic variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3600-3606.
- Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M., Poljak, M. 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3555-3557.
- Office International des Epizooties. 2009. Bovine tuberculosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009, pp. 1-16.
- Oh, P., Granich, R., Scott, J., Sun, B., Joseph, M., Stringfield, C., Thisdell, S., Staley, J., Workman-Malcolm, D., Borenstein, L., Lehnkering, E., Ryan, P., Soukup, J., Nitta, A., Flood, J. 2002. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1290-1293.
- Ohman, R., Ridell, M. 1995. Enzymatic and antigenic analyses of strains of *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 30: 161-165.
- Otal, I., Gómez, A.B., Kremer, K., de Haas, P., García, M.J., Martín, C., van Soolingen, D., 2008. Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet. Microbiol.* 129: 333-341.
- Palenque, E., Villena, V., Rebollo, M.J., Jiménez, M.S., Samper, S. 1998. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* to an immunocompetent patient. *Clin. Infect. Dis.* 26: 995-996.
- Palmer, M.V. 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315: 195-215.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet. Microbiol.* 97: 123-133.
- Parra, A., García, A., Inglis, N.F., Tato, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., Larrasa, J. 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Res. Vet. Sci.* 80: 140-146.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, J. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet. Microbiol.* 110: 293-300.
- Parreiras, P.M., Lobato, F.C., Alencar, A.P., Figueiredo, T., Gomes, H.M., Boéchat, N., Lage, A.P., Assis, R.A., Pereira, M.A., Souza, P.R., Mota, P.M., Suffys, P.N. 2004. Drug susceptibility of Brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using traditional and molecular techniques. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 749-752.
- Parsons, L.M., Brosch, R., Cole, S.T., Somoskovi, A., Loder, A., Bretzel, G., van Soolingen, D., Hale, Y.M., Salfinger, M. 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2339-2345.
- Parsons, L.M., Salfinger, M., Clobridge, A., Dormandy, J., Mirabello, L., Polletta, V.L., Sanic, A., Sinyavskiy, O., Larsen, S.C., Driscoll, J., Zickas, G., Taber, H.W., 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2218-2225.
- Pattyn, S.R., Antoine-Portaels, F., Kageruka, P., Gigase, P. 1970. *Mycobacterium microti* infection in a zoo-llama: *Lama vicugna* (Molina). *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 51, 17-24.

- Pavlik, I. 2006. The experience of new European Union Member States concerning the control of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 112: 221-230.
- Pavlik, I., Ayele, W.Y., Havelkova, M., Svejnochova, M., Katalinic-Jankovic, V., Zolnir-Dovc, M. 2004. *Mycobacterium bovis* infection in human population in four Central European countries during 1990-1999. *Vet. Med. Czech.* 48: 90-98.
- Pavlik, I., Ayele, W.Y., Parmova, I., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Körmendy, B., Nagy, G., Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Ocepek, M., Zolnir-Dovc, M., Lipiec, M. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* in animal and human population in six Central European countries during 1990-1999. *Vet. Med. Czech* 48: 83-89.
- Pavlik, I., Machackova, M., Yayo Ayele, W., Lamka, J., Parmova, I., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Körmendy, B., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Lipiec, M. 2002. Incidence of bovine tuberculosis in domestic animals other than cattle and in wild animals in six Central European countries during 1990-1999. *Vet. Med. Czech* 47: 122-131.
- Pavlik I., Trcka, I., Parmova, I., Svobodova, J., Melicharek, I., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Pate, M., Lipiec, M. 2005. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six Central European countries during the years 2000-2004. *Vet. Med. Czech* 50: 291-299.
- Payeur, J.B., Jarnagin, J.L., Marquardt, J.G., Whipple, D.L. 2002. Mycobacterial isolations in captive elephants in the United States. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969: 256-258.
- Pérez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B., Martín, C. 2001a. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol. Microbiol.* 41: 179-187.
- Pérez, J., Calzada, J., León-Vizcaino, L., Cubero, M.J., Velarde, J., Mozos, E. 2001b. Tuberculosis in an Iberian lynx (*Lynx pardina*). *Vet. Rec.* 148: 414-415.
- Pfaller, S.L., Aronson, T.W., Holtzman, A.E., Covert, T.C. 2007. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates recovered from southern California. *J. Med. Microbiol.* 56: 1152-1160.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B.R., Jacobs, W.R. Jr., Cole, S.T. 1996. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3132-3137.
- Phillips, C.J., Foster, C.R., Morris, P.A., Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74: 1-15.
- Pope, H. 1953. Antagonism of isoniazid by certain metabolites. *Am. Rev. Tuberc.* 68: 938-939.
- Pope, H. 1955. The neutralization of isoniazid activity in *Mycobacterium tuberculosis* by certain metabolites. *Am. Rev. Tuberc.* 73: 735-747.
- Poulet, S., Cole, S.T. 1995. Repeated DNA sequences in mycobacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 79-86.
- Prasad, H.K., Singhal, A., Mishra, A., Shah, N.P., Katoch, V.M., Thakral, S.S., Singh, D.V., Chumber, S., Bal, S., Aggarwal, S., Padma, M.V., Kumar, S., Singh, M.K., Acharya, S.K. 2005. Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85(5-6), 421-428.
- Pritchard, D.G., 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J. Comp Pathol.* 99: 357-399.
- Prod'hom, G., Guilhot, C., Gutiérrez, M.C., Varnerot, A., Gicquel, B., Vincent, V. 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3331-3334.
- Prodinger, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M.L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypnyk, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik I., Moser, I. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin. Microbiol.* 43: 4984-4992.

- Prodinger, W.M., Eigentler, A., Allerberger, F., Schonbauer, M., Glawischnig, W. 2002. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. J. Clin. Microbiol. 40: 2270-2272.
- Quigley, F.C., Costello, E., Flynn, O., Gogarty, A., McGuirk, J., Murphy, A., Egan, J. 1997. Isolation of mycobacteria from lymph node lesions in deer. Vet. Rec. 141: 516-518.
- Rahim, Z., Mollers, M., te Koppele-Vije, A., de Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., van Soolingen, D., Baqi, M.A., Heilmann, F.G., van der Zanden, A.G. 2007. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 38: 706-713.
- Ramaswamy, S., Musser, J.M., 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber. Lung Dis. 79: 3-29.
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T., Graviss, E.A. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1241-1250.
- Ramírez-Villaescusa, A.M., Medley, G.F., Mason, S., Green, L.E. 2010. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. Prev. Vet. Med.
- Ramos, A., Noblejas, A., Martín, T., Varela, A., Daza, R., Samper, S. 2004. Prolonged survival of an HIV-infected patient with multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* infection treated with surgical resection. Clin. Infect. Dis. 39: e53-e55.
- Rasolofo Razanamparany, V., Quirin, R., Rapaoliarjaona, A., Rakotoaritahina, H., Vololonirina, E.J., Rasolonavalona, T., Ferdinand, S., Sola, C., Rastogi, N., Ramarokoto, H., Chanteau, S. 2006. Usefulness of restriction fragment length polymorphism and spoligotyping for epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* in Madagascar: description of new genotypes. Vet. Microbiol. 114: 115-122.
- Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. 20: 21-54.
- Reed, G.B. 1957. Genus *Mycobacterium* (species affectin warm-blooded animal except those causing leprosy). In: R.S.Breed, E.G.D.M., N.R.Smith (Eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co.
- Regassa, A., Medhin, G., Ameni, G. 2008. Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active tuberculosis in central Ethiopia. Vet. J. 178: 119-125.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B.J., Ninet, B., Hirschel, B., Emler, S., 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 36: 1761-1764.
- Reisig, F., Kremer, K., Amthor, B., van Soolingen, D., Haas, W.H. 2005. Fast ligation-mediated PCR, a fast and reliable method for IS6110-based typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 43: 5622-5627.
- Reviriego Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P. 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. Vet. Microbiol. 112: 101-109.
- Rivero, A., Márquez, M., Santos, J., Pinedo, A., Sanchez, M.A., Esteve, A., Samper, S., Martín, C. 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. Clin. Infect. Dis. 32: 159-161.
- Robert, J., Boulahbal, F., Trystram, D., Truffot-Pernot, C., de Benoist, A.C., Vincent, V., Jarlier, V., Grosset, J. 1999. A national survey of human *Mycobacterium bovis* infection in France. Network of Microbiology Laboratories in France. Int J. Tuberc. Lung Dis. 3: 711-714.
- Robles, P., Esteban, J., Fernández, M.L. 2002. Pulmonary tuberculosis due to multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* in a healthy host. CID 35: 212-213.
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J. 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. Int J. Tuberc. Lung Dis. 13: 1536-1541.



- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A. 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet. Microbiol.* 141: 89-95.
- Rodwell, T.C., Moore, M., Moser, K.S., Brodine, S.K., Strathdee, S.A. 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 909-916.
- Romano, M.I., Alito, A., Fisanotti, J.C., Bigi, F., de Kantor, I., Cicuta, M.E., Cataldi, A. 1996. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 50: 59-71.
- Romero, B., Aranaz, A., Bezos, J., Álvarez, J., de Juan, L., Javed, M.T., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. 2007. Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 565-571.
- Romero, B., Aranaz, A., Bezos, J., Álvarez, J., de Juan, L., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. 2008. Single-nucleotide polymorphism in two representative multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates collected from patients in a Spanish hospital harboring a human infection outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46: 826-827.
- Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., Álvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3405-3408.
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Sánchez, C., Galka, M., Fernández, P., Mateos, A., Domínguez, L. 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Vet. Microbiol.* 132: 87-95.
- Romero, B., Rodríguez, S., Bezos, J., Díaz, R., Copano, M.F., Merediz, I., Mínguez, O., Marqués, S., Sáez, J.L., Mateos, A., Aranaz, A., Domínguez, L., de Juan, L. 2010. Humans as the Source of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Cattle. *Emerg. Infect. Dis.* Enviado.
- Roring, S., Brittain, D., Bunschoten, A.E., Hughes, M.S., Skuce, R.A., van Embden, D., Neill, S.D. 1998. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet. Microbiol.* 61: 111-120.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., Skuce, R. 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2126-2133.
- Roring, S., Scott, A.N., Glyn, H.R., Neill, S.D., Skuce, R.A. 2004. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet. Microbiol.* 101: 65-73.
- Ross, B.C., Jackson, K., Yang, M., Sievers, A., Dwyer, B. 1992a. Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2930-2933.
- Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K., Dwyer, B. 1992b. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* 30: 942-946.
- Rossetti, M.L., Valim, A.R., Silva, M.S., Rodrigues, V.S. 2002. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev. Saude Publica* 36: 525-532.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.* 69: 1-4.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67: 134-137.

- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., Brittain, D. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clin. Infect. Dis. 33: 305-311.
- Ruiz, P., Zerolo, F.J., Casal, M.J. 2000. Comparison of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. J Clin. Microbiol. 38: 4663-4664.
- Rullán, J.V., Herrera, D., Cano, R., Moreno, V., Godoy, P., Peiró, E.F., Castell, J., Ibáñez, C., Ortega, A., Agudo, L.S., Pozo, F. 1996. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. Emerg. Infect. Dis. 2: 125-129.
- Runyon, E.H. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. North Am. 43: 273-290.
- Runyon, E.H. 1967. *Micobacterium intracellulare*. Am.Rev.Respir.Dis. 95:861-865.
- Rüsch-Gerdes, S., Schroder, K.H., Fetting, C. 1985. Studies with the Bactec 460 system. Evaluation of sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. Comparison of the radiometric with the conventional method]. Prax. Klin. Pneumo. 39: 967-969.
- Ryan, T. J., Livingstone, P.G., Ramsey, D.S., de Lisle, G.W., Nugent, G., Collins, D.M., Buddle, B.M. 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. Vet. Microbiol. 112: 211-219.
- Samper, S., Iglesias, M.J., Rabanaque, M.J., Gómez, L.I., Lafoz, M.C., Jiménez, M.S., Ortega, A., Lezcano, M.A., van Soolingen, D., Martín, C. 2005. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. J. Clin. Microbiol. 43: 1220-1227.
- Samper, S., Martín, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blázquez, J., Baquero, F., van Soolingen, D., van Embden, J. 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS 11: 1237-1242.
- Sampson, S.L., Warren, R.M., Richardson, M., Victor, T.C., Jordaan, A.M., van der Spuy, G.D., van Helden, P.D. 2003. IS6110-mediated deletion polymorphism in the direct repeat region of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 185: 2856-2866.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Kallenius, G., Svenson, S.B., Almeida, V. 2009. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. J. Wildl. Dis. 45: 1048-1061.
- Sauret, J., Jolis, R., Ausina, V., Castro, E., Cornudella, R. 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. Tuber. Lung Dis. 73: 388-391.
- Scarpato, C., Ricordi, P., Ruggiero, G., Piccoli, P. 2004. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. J. Clin. Microbiol. 42: 1109-1114.
- Schmidt, V., Schneider, S., Schlomer, J., Krautwald-Junghanns, M.E., Richter, E. 2008. Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. Avian Pathol. 37: 589-592.
- Schultz, G., Deuter, H., Dedek, J. 1992. Zum Vorkommen von *Mycobacterium bovis*-Infektionen beim freilebenden Schwarzwild. Akademie Verlag, Berlin, pp. 51-53.
- Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y. 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 540-543.
- Scorpio, A., Zhang, Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat. Med. 2: 662-667.
- Sechi, L.A., Zanetti, S., Sanguinetti, M., Mollicotti, P., Romano, L., Leori, G., Delogu, G., Boccia, S., La Sorda, M., Fadda, G. 2001. Molecular basis of rifampin and isoniazid resistance in

- Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1645-1648.
- Serraino, A., Marchetti, G., Sanguinetti, V., Rossi, M.C., Zanoni, R.G., Catozzi, L., Bandera, A., Dini, W., Mignone, W., Franzetti, F., Gori, A. 1999. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. J. Clin. Microbiol. 37: 2766-2771.
- Shrikishna, D., de la Rua-Domenech, R., Smith, N.H., Colloff, A., Coutts, I., 2009. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? Thorax 64: 89-91.
- Silva, M.S., Senna, S.G., Ribeiro, M.O., Valim, A.R., Telles, M.A., Kritski, A., Morlock, G.P., Cooksey, R.C., Zaha, A., Rossetti, M.L. 2003. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 41: 4471-4474.
- Skuce, R.A., Brittain, D., Hughes, M.S., Beck, L.A., Neill, S.D. 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 32: 2387-2392.
- Skuce, R.A., Brittain, D., Hughes, M.S., Neill, S.D. 1996. Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J. Clin. Microbiol. 34: 2469-2474.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, R.G., Neill, S.D. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology 148: 519-528.
- Skuce, R.A., McDowell, S.W., Mallon, T.R., Luke, B., Breadon, E.L., Lagan, P.L., McCormick, C.M., McBride, S.H., Pollock, J.M. 2005. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). Vet. Rec. 157: 501-504.
- Smith, N. 1960. The 'Dassie' bacillus. Tubercle. 41: 203-212.
- Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J. 2009a. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. J. Clin. Microbiol. 47: 2551-2559.
- Smith, N.H., Dale, J., Inwald, J., Palmer, S., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Smith, J.M. 2003. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100: 15271-15275.
- Smith, N.H., Gordon, S.V., Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. 2006a. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat. Rev. Microbiol. 4: 670-681.
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R., Gordon, S.V. 2009b. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat. Rev. Microbiol. 7(7), 537-544.
- Smith, N.H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Hewinson, R.G., Smith, J.M. 2006b. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Theor. Biol. 239: 220-225.
- Snider, W.R. 1971. Tuberculosis in canine and feline populations. Review of the literature. Am. J. Respir. Dis. 104: 877-887.
- Sobrinho, R., Martín-Hernando, M.P., Vicente, J., Aurtenetxe, O., Garrido, J.M., Gortázar, C. 2008. Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) in Spain. Vet. Rec. 163: 159-160.
- Solano, V., Hernández, M.J., Martín, J.I., Martínez, E.V., Aribas, J.L. 2003. Occupational exposure to multiresistant *Mycobacterium bovis* in a hospital in Saragossa, Spain. Rev. Esp. Salud Publica 77: 201-209.
- Somaskovi, A., Kodmon, C., Lantos, A., Bartfai, Z., Tamasi, L., Fuzy, J., Magyar, P. 2000. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Lowenstein-Jensen medium. J. Clin. Microbiol. 38(6), 2395-2397.

- Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* 2: 164-168.
- Sorlozano, A., Soria, I., Román, J., Huertas, P., Soto, M.J., Piedrola, G., Gutiérrez, J. 2009. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1259-1264.
- Spies, F.S., da Silva, P.E., Ribeiro, M.O., Rossetti, M.L., Zaha, A. 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2947-2949.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M. 1997a. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 9869-9874.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. 1996. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1024-1026.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Deretic, V., Musser, J.M. 1997b. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 600-606.
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K.E., Pan, X., Kreiswirth, B.N., Moghazeh, S.L., Jacobs, W.R. Jr., Telenti, A., Musser, J.M. 1997c. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1677-1681.
- Srivastava, K., Chauhan, D.S., Gupta, P., Singh, H.B., Sharma, V.D., Yadav, V.S., Sreekumaran, Thakral, S.S., Dharamdheeran, J.S., Nigam, P., Prasad, H.K., Katoch, V.M. 2008. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India--possible relevance in human health. *Indian J. Med. Res.* 128: 26-31.
- Stead, W.W., Eisenach, K.D., Cave, M.D., Beggs, M.L., Templeton, G.L., Thoen, C.O., Bates, J.H. 1995. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151: 1267-1268.
- Stinear, T.P., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., Davies, J.K. 2000. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. *J. Bacteriol.* 182: 6322-6330.
- Stonebrink, B. 1958. The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. *Acta Tuberc. Scand.* 35: 67-80.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirol, M.L., Besnier, J.M., 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J. Clin. Microbiol.* 47: 1249-1251.
- Supply, P. 2006. Protocol and guidelines for Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis*. pp. 1-17.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Loch, C., van Soolingen, D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4498-4510.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., Loch, C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3563-3571.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., Loch, C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol. Microbiol.* 26: 991-1003.

- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36: 762-771.
- Tacquet, A., Tison, F. 1961. [New technic of isolation of mycobacteria by sodium laurylsulfate.]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 100: 676-680.
- Takiff, H.E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W.M., Kreiswirth, B., Cole, S.T., Jacobs, W.R. Jr., Telenti, A. 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 773-780.
- Talbot, E.A., Williams, D.L., Frothingham, R. 1997. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 35: 566-569.
- Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J., Steer, K. 2006. *Mycobacterium microti* isolated from two pigs. *Vet. Rec.* 159: 59-60.
- Telenti, A. 1998. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 53: 793-797.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647-650.
- Telenti, A., Philipp, W.J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K.E., Wieles, B., Musser, J.M., Jacobs, W.R. 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.* 3: 567-570.
- Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B. 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2668-2673.
- Thierry, D., Cave, M.D., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., Bates, J.H., Gicquel, B., Guesdon, J.L. 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18: 188-188.
- Thoen, C., LoBue, P., de Kantor, I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112: 339-345.
- Thompson, P.J., Cousins, D.V., Gow, B.L., Collins, D.M., Williamson, B.H., Dagnia, H.T. 1993. Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 164-167.
- Thorel, M.F. 1980. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle.* 61(2):101-104.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J.Syst.Bacteriol.* 40:254-260.
- Tison, F., Tacquet, A., Guillaume, J., Devulder, B. 1963. Unsuitability of the basic coletsos medium for the measurement of the sensitivity to cycloserine. Inactivation of cycloserine by sodium pyruvate. *Ann. Inst. Pasteur Lille.* 14: 117-124.
- Torres-Cruz, J., van der Woude, M.W. 2003. Slipped-strand mispairing can function as a phase variation mechanism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185: 6990-6994.
- Tortoli, E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48: 159-178.
- Tortoli, E., Rindi, L., García, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R.M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M.I., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1277-1285.
- Tweddle, N.E., Livingstone, P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 40: 23-39.

- Une,Y., Mori,T. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 415-425.
- United States Department of Agriculture. 2009. A New Approach for Managing Bovine Tuberculosis: Veterinary Services' Proposed Action Plan. pp. 1-12.
- Valencia, M.E., Moreno, V., Laguna, F., González-Lahoz, J.M. 2001. Multiresistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* and human immunodeficiency virus infection. Are there new therapeutic possibilities?. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 19: 37-39.
- van der Zanden, A.G., Kremer, K., Schouls, L.M., Caimi, K., Cataldi, A., Hulleman, A., Nagelkerke, N.J., van Soolingen, D., 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4628-4639.
- van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., Der Zeijst, B.A., Schouls, L.M. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2393-2401.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Haagsma, J., Eger, T., Hermans, P.W., Ritacco, V., Alito, A., van Embden, J.D. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2425-2433.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P., van Embden, J. 1995. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. The National Institute of Public Health and Environmental Protection. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Groenen, P.M., van Embden, J.D. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1987-1995.
- van Soolingen, D., Hermans, P.W., de Haas, P.E., van Embden, J.D. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1772-1777.
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J. Syst. Bacteriol.* 47: 1236-1245.
- van Soolingen, D., van der Zanden, A.G., de Haas, P.E., Noordhoek, G.T., Kiers, A., Foudraïne, N.A., Portaels, F., Kolk, A.H., Kremer, K., van Embden, J.D. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1840-1845.
- Vestal, A.L. 1975. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Centers for Disease Control, PHS, Atlanta.
- Veterinary Laboratories Agency. 2005. Frequency of spoligotypes in Great Britain. <http://www.mbovis.org/spoligodatabase/GBmetadata/frequency%20spoligo%20GB.html>.
- Viana-Niero, C., Gutierrez, C., Sola, C., Filliol, I., Boulahbal, F., Vincent, V., Rastogi, N. 2001. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J. Clin. Microbiol.* 39: 57-65.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernández de Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortázar, C. 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet. Res.* 38: 451-464.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernández de Mera, I.G., Juste, R., Barral, M., Gortázar, C. 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet. Res.* 37: 107-119.

- Vilchèze, C., Jacobs, W.R. 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 35-50.
- Vordermeier, M., Whelan, A., Ewer, K., Goodchild, T., Clifton-Hadley, R., Williams, J., Hewinson, R.G., 2006. Bovine TB. Special Edition. *Government Veterinary Journal* 16: 1-92.
- Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Leviser, S. 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181: 284-285.
- Wang, J.C. 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 665-697.
- Warren, R.M., Streicher, E.M., Sampson, S.L., van der Spuy, G.D., Richardson, M., Nguyen, D., Behr, M.A., Victor, T.C., van Helden, P.D. 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4457-4465.
- Wasem, C.F., McCarthy, C.M., Murray, L.W. 1991. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of the *Mycobacterium avium* complex and other mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 29: 264-271.
- Wells, A.Q., Oxen, D.M., 1937. Tuberculosis in voles. *Lancet* 1: 1221.
- Whelan, A.O., Coad, M., Cockle, P.J., Hewinson, G., Vordermeier, M., Gordon, S.V. 2010. Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle. *PLoS ONE*. 5: e8527.
- Wiid, I.J., Werely, C., Beyers, N., Donald, P., van Helden, P.D. 1994. Oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub> as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1318-1321.
- Wilkins, M.J., Bartlett, P.C., Frawley, B., O'Brien, D.J., Miller, C.E., Boulton, M.L. 2003. *Mycobacterium bovis* (bovine TB) exposure as a recreational risk for hunters: results of a Michigan Hunter Survey, 2001. *Int J. Tuberc. Lung Dis.* 7: 1001-1009.
- Wilkins, M.J., Bartlett, P.C., Judge, L.J., Erskine, R.J., Boulton, M.L., Kaneene, J.B. 2009. Veterinarian injuries associated with bovine TB testing livestock in Michigan, 2001. *Prev. Vet. Med.* 89: 185-190.
- Wilkins, M.J., Meyerson, J., Bartlett, P.C., Spieldenner, S.L., Berry, D.E., Mosher, L.B., Kaneene, J.B., Robinson-Dunn, B., Stobierski, M.G., Boulton, M.L. 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection and bovine tuberculosis outbreak, Michigan, 1994-2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 657-660.
- Williams-Bouyer, N., Yorke, R., Lee, H.I., Woods, G.L. 2000. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4167-4170.
- Wilson, G., Broughan, J., Chambers, M., Clifton-Hadley, R., Crawshaw, T., de la Fuente, J., Delahay, R.J., Gavier-Widen, D., Gortázar, C., Hewinson, G., Jackson, V., Martín-Hernando, M.P., Paz, M., Aleksija, N., Salguero, F.J., Vicente, J., Alastair, W., McDonald, R. 2009. Scientific review on Tuberculosis in wildlife in the EU. 1-117.
- Wilton, S., Cousins, D. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1: 269-273.
- Wobeser, G. 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *Can. Vet. J.* 50: 1169-1176.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Plackett, P. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Sci.* 49: 46-49.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweddle, N.E. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68: 286-290.
- World Health Organization. 2009. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Rep WHO Report 2009. pp. 1-314; [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/pdf/full\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf).

- World Health Organization. 2010. Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes-4th Edition. pp. 1-160; [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf).
- Yakrus, M.A., Hernández, S.M., Floyd, M.M., Sikes, D., Butler, W.R., Metchock, B. 2001. Comparison of methods for Identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. J. Clin. Microbiol. 39: 4103-4110.
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Ferme, M., Karoui, C., Boschirolì, M.L. 2008a. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. J. Wildl. Dis. 44: 99-108.
- Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschirolì, M.L., Durand, B. 2008b. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. Vet. Rec. 163: 43-47.
- Zhang, H., Bi, L.J., Li, C.Y., Sun, Z.G., Deng, J.Y., Zhang, X.E. 2009. Mutations found in the *pncA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical pyrazinamide-resistant isolates from a local region of China. J. Int Med. Res. 37: 1430-1435.
- Zhang, Y., Mitchison, D. 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J. Tuberc. Lung Dis. 7: 6-21.
- Zhang, Y., Wallace, R.J. Jr., Mazurek, G.H. 1995. Genetic differences between BCG substrains. Tuber. Lung Dis. 76: 43-50.
- Zhang, Y., Young, D. 1994. Strain variation in the *katG* region of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol. 14: 301-308.
- Zumárraga, M.J., Martín, C., Samper, S., Alito, A., Latini, O., Bigi, F., Roxo, E., Cicuta, M.E., Errico, F., Ramos, M.C., Cataldi, A., van Soolingen, D., Romano, M.I. 1999. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. J. Clin. Microbiol. 37: 296-303.
- Zumárraga, M.J., Vivot, M.M., Marticorena, D., Bernardelli, A., Fasan, R., Lachini, R., Cataldi, A.A. 2009. *Mycobacterium bovis* in Argentina: isolates from cats typified by spoligotyping. Rev. Argent Microbiol. 41: 215-217.



